

**Abbau von Immunglobulin G1 im Gingivafluid und Korrelation
mit parodontopathogenen Keimen unter besonderer
Berücksichtigung von Porphyromonas gingivalis und dessen
Protease Gingipain K**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Christiane Hirsch
geboren am 19.07.1982 in Jena

Gutachter

1. PD Dr. Sigrun Eick, Jena
2. Prof. Dr. Eike Glockmann, Jena
3. Prof. Dr. Thomas Hoffmann, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2010

Abkürzungsverzeichnis

A.a./A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
A. dest.	Aqua destillata
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
A. meyeri	Actinomyces meyeri
AP	aggressive Parodontitis
API	Approximalraum-Plaque-Index
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AV	Attachmentverlust
BoP	Blutung bei Sondierung, engl. bleeding on probing
BSA	bovines Serumalbumin
C. ochracea	Capnocytophaga ochracea
CP	chronische Parodontitis
CPI	Community-Periodontal-Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Chemilumineszenz, engl. enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E. nodatum	Eubacterium nodatum
EZM	extrazelluläre Matrix
Fc	kristallines (engl. crystallizable) Fragment
FFRck	Phe-Phe-Arg-chloromethylketone, Proteinaseinhibitor
GCF	Sulkusflüssigkeit, engl. gingival crevicular fluid

hc/H-Kette	schwere Kette, engl. heavy chain
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kgp	Gingipain K
lc/L-Kette	leichte Kette, engl. light chain
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure
Lys	Lysin
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex, engl. major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metall-Protease
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
P. asaccharolytica	Porphyromonas asaccharolytica
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
P. endodontalis	Porphyromonas endodontalis
P.g./P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
P.i./P. intermedia	Prevotella intermedia
P. loeschei	Prevotella loeschei
PMN	polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
P. oralis	Prevotella oralis
PSI	Parodontaler Screening Index
Rgp	Gingipain R
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. rounds per minute
SBI	Sulkus-Blutungs-Index

SD	Standardabweichung, engl. standard deviation
SDS	Natrium(engl. Sodium)-Dodecylsulfat
ST	Sondierungstiefe (engl. PD, probing depth)
TBS-T	Tris Buffered Saline, mit Tween 20
T.d./T. denticola	Treponema denticola
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T.f./T. forsythia	Tannerella forsythia
TNF	Tumornekrosefaktor

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Zur Bedeutung der Parodontitis	3
2.2	Definition und aktuelle Klassifikation der Parodontitiden	3
2.3	Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	5
2.4	Parodontopathogene Bakterien	6
2.5	Immunglobuline als Teil des parodontalen Abwehrsystems	16
2.6	Abbau von Peptiden und Proteinen	20
3	Zielstellung	22
4	Material und Methode	23
4.1	Auswahl der Probanden	23
4.2	Klinische Untersuchung der Teilnehmer	24
4.3	Probenentnahme	24
4.4	Detektion von IgG1 und IgG2	25
4.4.1	Prinzip	25
4.4.2	Durchführung	26
4.5	Nachweis der parodontopathogenen Keime	30
4.5.1	Prinzip	30
4.5.2	Durchführung	30
4.6	Bestimmung der Gingipain K-Konzentration	33
4.6.1	Prinzip	33
4.6.2	Vorversuche	34
4.6.3	Durchführung	36
4.7.	Statistische Auswertung	39
5	Ergebnisse	40
5.1	Klinische Daten	40
5.2	Nachweis parodontopathogener Bakterien	41
5.3	Bestimmung des Gingipain K-Spiegels	45
5.4	Abbau von Immunoglobulin G1 und G2	47

5.5	Zusammenhang von Mikroflora, Kgp und IgG1-Abbau	51
6	Diskussion	54
6.1	Material und Methoden	54
6.2	Diskussion der Ergebnisse	57
7	Schlussfolgerungen	69
8	Literaturverzeichnis	70
9	Anhang	83

1 Zusammenfassung

Antikörper leisten als Teil des spezifischen Immunsystems einen wichtigen Beitrag zur Eliminierung von Bakterien und deren Virulenzfaktoren. IgG ist sowohl im Serum als auch in der Sulkusflüssigkeit (GCF) das häufigste Immunglobulin (Ig) des Menschen, etwa 70% davon werden von der Subklasse IgG1 eingenommen. Zahlreiche Keime besitzen die Fähigkeit, diese Glykoproteine zu spalten. Für Gingipain K (Kgp), eine Protease des Erregers *P. gingivalis*, ist neben der Spaltstelle in der schweren Kette des IgG1 eine hohe Spezifität bekannt. Die meisten Studien hierzu basieren auf In-vitro-Versuchen.

Es sollte daher herausgefunden werden, ob der Abbau von IgG1 im gingivalen Sulkus von Bedeutung ist und mit *P. gingivalis* sowie Kgp in Verbindung gebracht werden kann. Auch der Einfluss weiterer parodontopathogener Bakterien sollte untersucht werden, darunter die anderen Vertreter des roten Komplexes - *T. forsythia* und *T. denticola* - sowie *A. actinomycetemcomitans* und der stark proteolytische *P. intermedia*. Zudem sollten der Einfluss der Sondierungstiefe (ST) und eventuelle Unterschiede zwischen generalisierter aggressiver (AP) und chronischer (CP) Parodontitis eruiert werden. Der Nachweis von Kgp in der GCF geschah bisher nur mittels Aktivitätsmessung und damit eingeschränkter Spezifität. Hier sollte ein quantitativer, hochspezifischer Nachweis mittels ELISA erfolgen.

Dazu wurden jeweils neun Patienten mit AP und CP sowie fünf parodontal gesunde Kontrollpersonen ausgewählt. Die Proben der GCF wurden durch die intracreviculäre Waschmethode gewonnen. Dabei wurden pro Patient jeweils 2 Sites mit $\leq 3,5$ mm ST, 4-5,5 mm ST und ≥ 6 mm ST berücksichtigt, bei den gesunden Personen nur 2 Stellen. Die Belastung der einzelnen Proben durch die genannten Erreger wurde mit der Real-time PCR gemessen. Anschließend wurde mittels ELISA die Konzentration des Kgp der Probenflüssigkeiten ermittelt. Die Untersuchung auf einen Abbau von IgG1 geschah durch SDS-PAGE und anschließende Detektion der schweren Ketten des Moleküls im Western Blot. Zum Vergleich diente der Nachweis einer IgG2-Spaltung.

Die Ergebnisse der PCR zeigten dabei hohe Belastungen der Patientenproben mit den Erregern des roten Komplexes, weniger mit *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia*. Signifikante Unterschiede zwischen AP und CP waren dabei nicht nachzuweisen. Die ST zeigte großen Einfluss auf die Keimzahlen von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*.

In der Kontrollgruppe waren lediglich *T. forsythia* und *A. actinomycetemcomitans* in geringen Mengen nachweisbar. Die Kgp-Konzentration konnte mit der angewandten Methode bestimmt werden, allerdings gelang dies nur bei 13 der 108 Proben aus den Patientengruppen. Neben einer Abhängigkeit von der ST war auch eine Tendenz zu vermehrtem Auftreten bei AP-Patienten zu finden. Die Konzentration der Protease korrelierte zwar signifikant mit den Keimzahlen des *P. gingivalis*, allerdings gab es viele *P. gingivalis*-positive Proben ohne Kgp-Nachweis. Die gesuchten Fragmente des IgG1 konnten ebenfalls nur bei den Patienten gefunden werden (56% positive Patienten, 26% positive Proben) und zeigten ähnlich wie Kgp vermehrt positive Stellen mit steigender ST sowie eine Tendenz zur AP. Die gesuchten Spaltstücke standen ebenfalls in signifikantem Zusammenhang zu den Keimzahlen von *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *T. forsythia* sowie in signifikantem Zusammenhang zu Kgp. Oft jedoch wurden die Spaltung auch ohne Kgp-Nachweis gefunden oder trotz hoher Keimzahlen der Erreger keine Spaltstücke nachgewiesen. Für IgG2 sind keine entsprechenden Fragmente detektiert worden. Beide Antikörper zeigten jedoch unregelmäßig weitere Fragmente verschiedener Größen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Kgp-Nachweis eventuell durch Wechselwirkungen der Protease mit Substanzen in der GCF beeinträchtigt ist und optimiert werden muss. Die Spaltung von IgG1 in der GCF kann nicht anhand eines Virulenzfaktors erklärt werden. Sie erfolgt durch verschiedene bakterielle und wirtseigene Enzyme, wobei stark proteolytische Erreger wie *P. gingivalis* und *P. intermedia* großen Anteil haben. Auch Glykosidase-produzierende Keime wie *T. forsythia* spielen eine Rolle. Der Abbau erfolgt stufenweise bis zu Fragmenten unterhalb der Nachweisgrenze. Mit zunehmender Sondierungstiefe nehmen die bakterielle Besiedlung parodontaler Taschen und damit die Reichhaltigkeit der Proteasen zu, was zum einen die Antikörper-Produktion, aber auch deren Abbau fördert. Bei Patienten mit AP könnte dies durch eine übersteigerte Produktion wirtseigener Proteasen, etwa der humanen neutrophilen Elastase, gefördert werden. Dieser Antikörperabbau bietet den Erregern des dentalen Biofilms Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes und liefert ihnen Nährstoffe. Die IgG-Subklassenverteilung wird verändert. Eine Hemmung der Proteasen sollte als neuer Therapieansatz erwogen werden.

2 Einleitung

2.1 Zur Bedeutung der Parodontitis

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) belasten Parodontalerkrankungen nach wie vor große Teile der Bevölkerung weltweit. So ergaben Daten zahlreicher teilnehmender Länder, dass allein 10-15% der Menschen an einer schweren Form der Parodontitis (CPI-Grad 4) leiden. Die Prävalenz steigt dabei mit zunehmendem Lebensalter an. Sind am Beispiel Europas nur 5% der 15-19-jährigen betroffen, so sind es bereits 50% der 35-44-jährigen und schließlich zwei Drittel der Personen zwischen 65 und 74 Jahren (Petersen und Ogawa 2005). Folglich ist Parodontitis die zweithäufigste Ursache für Zahnverlust im Erwachsenenalter, bei Patienten über 45 Jahren sogar der dominierende Grund (Glockmann und Köhler 1998, Reich und Hiller 1993, Aida et al. 2006, Panzner et al. 2009). Aber auch die systemischen Auswirkungen parodontaler Erkrankungen stehen seit Jahren im Interesse der Wissenschaft. So gilt etwa die gegenseitige negative Beeinflussung von Parodontitis und der Volkskrankheit Diabetes mellitus als sicher (Lamster et al. 2008). Auch wurde ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose, koronare Herzkrankheit und Schlaganfälle nachgewiesen (Persson und Persson 2008, Meurman et al. 2004, Mustapha et al. 2007).

In einer Übersichtsarbeit zum Wandel der weltweiten Prävalenz von Parodontalerkrankungen schlussfolgern Hugoson und Norderyd (2008), dass die bisherige Forschung vor allem in Europa, Nordamerika und Teilen Asiens zu einer Verbesserung der Mundhygiene beigetragen haben. Dieser Erfolg ist mit rückläufigen Zahlen von Gingivitis sowie milder und moderater Parodontitis assoziiert. Gerade aber für schwere Formen der Parodontitis, welche klinisch oft als wiederkehrend oder therapierefraktär imponieren, sollten weitere Untersuchungen dazu beitragen, die Ursachen jener Misserfolge herauszufinden und neue Therapieansätze zu entwickeln (Lindhe et al. 1999).

2.2 Definition und aktuelle Klassifikation der Parodontitiden

Die meisten Formen der Parodontitis können als chronische Entzündung des gesamten Zahnhalteapparates mikrobiellen Ursprungs angesehen werden. Sie zeichnen sich durch Entzündung der Gingiva, Abbau des Alveolarknochens, Bildung parodontaler Taschen und damit einen klinischen Attachmentverlust (AV) aus. Als Spätfolge kann es zu Lockerung

und Verlust des betroffenen Zahnes kommen (Page und Schröder 1976, Flemmig 1999). Abgesehen von diesen allgemein geltenden Symptomen existiert eine Vielzahl klinischer Erscheinungsformen der Parodontitis.

Die derzeit gültige Klassifikation ist das Resultat des „International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions“ aus dem Jahre 1999, welche folgende Einteilung vorsieht (Armitage 1999):

- I. Gingivale Erkrankungen
- II. Chronische Parodontitis
- III. Aggressive Parodontitis
- IV. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
- V. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- VI. Parodontaler Abszess
- VII. Parodontitis assoziiert mit endodontalen Läsionen
- VIII. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände

In die vorliegende Studie wurden Patienten mit generalisierter Form von chronischer und aggressiver Parodontitis eingeschlossen.

Die **chronische Parodontitis** ist die häufigste Form der Parodontitiden und zeigt mit steigendem Alter eine zunehmende Prävalenz. Für das klinische Bild ist eine deutliche Häufung von Plaque, Zahnstein, subgingivalem Konkrement und anderen lokalen Reizfaktoren charakteristisch. Obwohl die Krankheit eher schleichend verläuft, kommt es nicht selten zu Schüben rascherer Progression (Lindhe et al. 1999, Socransky et al. 1998). Nur etwa 1% der Bevölkerung leidet an **aggressiver Parodontitis** (Trevilatto et al. 2002), wobei eine familiäre Häufung besteht. Leitsymptome sind ein auffällig rasanter Attachmentverlust und vertikaler Knochenabbau bei sonstiger klinischer Gesundheit. Ablagerungen von Plaque und Konkrement stehen nicht zwingend im Verhältnis zur Schwere der Erkrankung (Mombelli et al. 2002, Trevilatto et al. 2002) Neben einer hochvirulenten Mikroflora steht der genetische Hintergrund im Mittelpunkt der Ursachenforschung (Lang et al. 1999).

2.3 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Wie alle chronischen Entzündungen unterliegt auch die Parodontitis einem mannigfachen Ursachenkomplex. Die initiiierende Rolle von Plaquebakterien wurde bereits in den 60er Jahren anhand experimentell erzeugter Gingivitis beim Menschen entdeckt. Bis heute weiß man jedoch, dass es vielmehr von dem komplexen Zusammenspiel bakterieller Virulenzfaktoren, wirtseigener Abwehr- und Entzündungsparameter sowie weiterer äußerer Einflüsse abhängt, ob sich ein derartiges Krankheitsgeschehen entwickeln kann (Bascones-Martinez und Figuero-Ruiz 2005).

So ist auch im Gesunden jede Zahnoberfläche von einer dünnen Schicht bakterieller Plaque besiedelt. Diese wird vorwiegend von grampositiven, aeroben Keimen gebildet. 90% davon sind Streptokokken und Actinomyceten. Diese halten potentielle Nischen für parodontopathogene Keime besetzt und unterstützen damit die Physiologie des Zahnhalteapparates. Findet jedoch ungehemmtes Wachstum des Biofilms statt, vollzieht sich durch den damit verbundenen Sauerstoffmangel ein Wandel hin zu einer eher gramnegativen, anaeroben Flora, welche weitaus höhere Virulenz besitzt (Roberts und Darveau 2002, Listgarten 1986).

Die damit verbundene Ansammlung chemotaktisch oder toxisch wirkender bakterieller Produkte ruft bereits nach zwei bis vier Tagen die ersten gingivalen Entzündungsreaktionen hervor, deren Histologie 1976 von Page und Schröder beschrieben worden ist. Neben fortschreitender Zerstörung des gingivalen Attachmentapparates kommt es zu einer Einwanderung von Abwehrzellen. Zu Beginn sind dies vorwiegend neutrophile Granulozyten. Später kommen T-Lymphozyten und schließlich B-Lymphozyten (oder Plasmazellen) hinzu (Brex et al. 1988, Kinane 2001). Der während des Entzündungsgeschehens dilatierte subepitheliale Gefäßplexus weist zudem eine erhöhte Permeabilität auf, was zu einer vermehrten Fließrate der Sulkusflüssigkeit führt.

Bei Reduktion der mikrobiellen Last sind die gingivalen Veränderungen bis dahin vollständig reversibel und können jahrelang ohne Progression bestehen bleiben. Nimmt die Virulenz der Mikroflora zu oder kommt es zu einer Alteration der Abwehrlage des Wirtes, kann sich die Parodontitis entwickeln. Charakteristisch sind neben dem Verlust desmodontaler Fasern und des alveolären Knochens eine Fibrosierung des gingivalen Gewebes. Der Sulkus wandelt sich somit – fast immer irreversibel - in eine parodontale Tasche um (Hellwig et al. 2003).

Der weitere Verlauf der parodontalen Destruktion ist von sehr individuellem Charakter (Flemmig 1999, Kinane 2001). Ursache hierfür sind zahlreiche Risikofaktoren, darunter vor allem das Rauchen und ein bestehender Diabetes mellitus (Salvi et al. 2008, Laxman und Annaji 2008, Pöllänen et al. 2003). Weniger gut erforscht ist der genetische Hintergrund parodontaler Erkrankungen, welchem einige Autoren immerhin 30-60% der klinischen Variabilität zuschreiben. Die Ergebnisse derartiger Studien differieren jedoch enorm. Hier scheint der ebenfalls propagierte Einfluss ethnischer Herkunft oder zahlreicher Umweltfaktoren zum Tragen zu kommen (Kornman 2008, Nibali et al. 2007, Ren et al. 2008, Kobayashi et al. 2000). Weitere Risikofaktoren können sich hinter hormonellen Unterschieden der Geschlechter, Folgen individueller Stressverarbeitung sowie zahlreichen anderen Grunderkrankungen, vor allem jenen mit geschwächter Immunantwort, verbergen. Vermehrte Plaqueretention durch Zahnfehlstellung, defekte Restaurationsränder oder auch die permanente Belastung durch okklusale Traumata sind maßgeblich an sitespezifischen Unterschieden beteiligt (Genco 1996).

2.4 Parodontopathogene Bakterien

Allein in der subgingivalen Plaque konnten bisher über 400 Bakterienarten gefunden werden. Nach Auswertung von mehr als 13000 Plaqueproben wurden einige dieser Keime 1998 von Socransky et al. in farblich markierte Komplexe eingeordnet. Wie die meisten, vorwiegend grampositiven und aeroben Plaquebakterien, können die Vertreter des gelben, grünen und lilafarbenen Komplexes mit parodontaler Gesundheit einhergehen. Sie spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung einer adäquaten Immunantwort an der empfindlichen dento-gingivalen Grenze (Roberts und Darveau 2002). Im Gegensatz dazu sind die Vertreter des roten Komplexes - *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* - sehr deutlich mit pathologischen parodontalen Verhältnissen assoziiert (Socransky et al. 1998). Auch einige Serotypen von *A. actinomycetemcomitans* gelten als stark parodontopathogen (Kaplan et al. 2001). Häufiger als diese Erreger sind Vertreter des orangenen Komplexes zu finden. Sie werden sowohl in gesunden als auch in erkrankten Sites beobachtet und scheinen die Ansiedlung der stark pathogenen Bakterien zu begünstigen. Vertreter dieses Komplexes sind unter anderem *P. intermedia*, *F. nucleatum* und *C. rectus*.

Im Folgenden sollen die im Rahmen der vorliegenden Studie nachgewiesenen Keime näher charakterisiert werden.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Dieser Keim, vormals *Actinobacillus* oder *Haemophilus actinomycetemcomitans*, wurde nach langer Uneinigkeit hinsichtlich seiner Taxonomie der Gattung *Aggregatibacter* zugeordnet. Der gramnegative, fakultativ anaerobe und unbewegliche Kokkobazillus benötigt für optimales Wachstum ein Milieu mit 5% CO₂ (Norskov-Lauritsen und Kilian 2006). Das vorwiegende Habitat ist der dentale Biofilm, aber auch Speichel und die orale Mucosa (Haase et al. 1999). Nicht selten ist *A. actinomycetemcomitans* Begleitkeim von Actinomycosen. Extraorales Vorkommen wurde bei Endokarditiden, intrakraniellen Infektionen, solchen des Thorax, des Urogenitaltraktes und der Haut, oft als Abszess, beschrieben (van Winkelhoff und Slots 1999, Kaplan et al. 2001). Weitaus mehr Bedeutung besitzt *A. actinomycetemcomitans* als parodontopathogener Erreger, wo er vor allem mit der lokalisierten aggressiven Parodontitis in Verbindung gebracht wird. Aber auch bei parodontal gesunden Personen, sowie schweren Formen der chronischen und therapierefraktären Parodontitis ist er vertreten (Slots 1999, Fine et al 2007, Trevilatto et al. 2002).

Wie diese Heterogenität vermuten lässt, besitzt der einfache Nachweis des Bakteriums ohne weitere Differenzierung nur wenig diagnostischen Wert (Schacher et al. 2007). So konnten bisher 6 Serotypen (a-f) unterschieden werden, welche durch Polysaccharide des LPS's begründet sind. Die meisten Personen sind Träger nur eines Serotyps, wobei die Typen a-c am häufigsten vorkommen. Mit schweren Formen der aggressiven Parodontitis sind die Serotypen b und f vergesellschaftet, was besonders bei Kindern und jungen Erwachsenen afro-amerikanischer Herkunft zu beobachten ist (Fine et al. 2007, Kaplan et al. 2001). Das LPS selbst stimuliert das Entzündungsgeschehen, die Freisetzung von MMPs und die Osteoklastogenese. Folge dieser Prozesse sind die Zerstörung der extrazellulären Matrix und ein rascher Abbau des Alveolarknochens (Rogers et al. 2007, Takahashi et al. 2008).

A. actinomycetemcomitans adhärirt an Hydroxylapatit, Speichelbestandteilen, verschiedenen Wirtszellen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Haase et al. 1999, Gutiérrez-Venegas et al. 2007). Maßgeblich daran beteiligt sind Fimbrien, Exopolysaccharide und (Tad-) Membranproteine (Inoue et al. 2003, Schreiner et al. 2003). Ebenso ausgeprägt ist das invasive Verhalten des Keimes. Über rezeptorvermittelte

Endocytose dringt er in Epithelzellen ein, von wo aus er sich nach sehr rascher Replikation von Zelle zu Zelle ausbreitet (Fives-Taylor et al. 1999, van Winkelhoff und Slots 1999). Weitere potente Virulenzfaktoren von *A. actinomycetemcomitans* stellen die von ihm produzierten Toxine dar. Beispiele sind das Poren-bildende Leukotoxin (LtxA) und das cytoletale Toxin, welches DNase-Aktivität besitzt. Sie können die Apoptose von Leukozyten und Epithelzellen auslösen (Fives-Taylor et al. 1999, Shenker et al. 2006, Kang et al. 2005). Bacteriozine schließlich verschaffen dem Keim einen Kolonisationsvorteil (Lúcia et al. 2002).

Die proteolytischen Fähigkeiten des Bakteriums sind weniger erforscht und gelten derzeit als gering (Potempa et al. 2000). Nachgewiesen wurden etwa Proteasen mit der Fähigkeit zum Abbau von Kollagen Typ I und Fibronectin. Unspezifische proteolytische Aktivität mit Alanin-/Lysin-Spezifität wurde ebenfalls gefunden (Eley und Cox 2003, Wang et al. 2001, Gazi et al. 1997). Derartige Enzyme könnten auch den von Gregory et al. (1992) beschriebenen Abbau der Immunglobuline G, A und M verursachen. Jansen et al. (1994) konnten jedoch keinen Abbau von IgG feststellen.

Wie vielfach nachgewiesen, führt eine Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* vor allem bei der lokalisierten aggressiven Parodontitis zu sehr hohen IgG-Titern (Kinane et al. 1999). Mitogene Reize auf B-Lymphozyten konnten besonders dem LPS und einem weiteren immunstimulierenden Faktor zugeschrieben werden (Henderson 2003, Jeong et al. 2000). Gegen die protektive Wirkung dieser Antikörper besitzt der Keim jedoch ein Fc-Bindungsprotein (Omp34) auf der Zelloberfläche. Hierdurch können Phagocytose und Komplementaktivierung limitiert sowie andere antigene Strukturen der Zelle maskiert werden (Fives-Taylor et al. 1999, Mintz und Fives-Taylor 1994, Henderson et al. 2003).

Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis ist ein Vertreter der gramnegativen, obligat anaeroben und unbeweglichen Stäbchen. Die Gattung wurde von den *Bacteroides* abgegrenzt und ist durch asaccharolytische Vertreter gekennzeichnet (Marsh und Martin 2003, Mayrand und Holt 1988). Die typische ökologische Nische des Keimes ist die entzündliche parodontale Tasche, ebenso jedoch andere orale Oberflächen und der Speichel. Extraorales Vorkommen, etwa bei Abszessen und entzündlichen Erkrankungen der Atemwege, wurde beschrieben (Mayrand und Holt 1988, van Winkelhoff und Slots 1999).

Der obligate Anaerobier kann den frühen Biofilm nicht kolonisieren. Daher adhäriert er an Streptokokken und Actinomyceten, Brückenkeimen wie *F. nucleatum* und anderen Spätbesiedlern, etwa *T. denticola* und *T. forsythia* (Lamont und Jenkinson 1998, Asikainen und Chen 1999). Von einer Infektion sind vorwiegend Erwachsene betroffen (Petit et al. 1994).

Diese hohe Pathogenität verdankt *P. gingivalis* seinen zahlreichen Virulenzfaktoren. So besitzen einige Stämme eine Polysaccharidkapsel. Anhand derer K-Antigene wurde *P. gingivalis* bisher in 6 Serotypen (K1-6) eingeteilt. Die vermehrte Virulenz bekapselter Keime wird durch die erhöhte Resistenz gegen Phagozytose und antibakterielle Serumkomponenten erzielt (Mayrand und Holt 1988, Laine et al. 1997).

Voraussetzung für eine Infektion sind Adhärenz und Invasion. *P. gingivalis* ist in der Lage, an Epithelzellen, Fibroblasten, Matrix- und Speichelbestandteile zu adhären. Von Bedeutung für diese Vorgänge sind Hämagglutinine, verschiedene Proteasen, Lipopolysaccharide, zahlreiche weitere Proteinstrukturen der äußeren Membran (Lamont und Jenkinson 1998, Hamada et al. 1998) und Fimbrien. Von diesen sind vor allem zwei Typen, Major Fimbrien (FimA) und Minor Fimbrien (Mfa1), beschrieben worden. Erstere werden in sechs Genotypen (I-V und Ib) eingeteilt, von denen besonders die Typen II und IV mit schweren Formen der Parodontitis assoziiert sind. Die meisten Personen beherbergen nur einen Genotyp. Die Fimbrien können zudem die Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine, darunter IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α , aus verschiedenen Wirtszellen und eine Produktion der Immunglobuline A und G induzieren. Ebenso dienen sie der bakteriellen Koaggregation (Amano et al. 2004, Hamada et al. 1998, Eick et al. 2006). Die Lipopolysaccharide von *P. gingivalis* besitzen eine vergleichsweise geringe Endotoxinaktivität. (Holt et al. 1999). Darüber hinaus sind eine Induktion proinflammatorischer Cytokine (Chen et al. 2008), Aktivierung polyklonaler B-Zellen (Holt et al. 1999) und Osteoklastendifferenzierung durch das LPS bekannt (Yasuhara et al. 2009) Ähnliche Wirkungen erzielen auch die Hitzeschockproteine des Keimes (Choi et al. 2004, Shelburne et al. 2007).

Eine weitere Gruppe bedeutender Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* bilden dessen zahlreiche Proteasen. Allein 85% der proteolytischen Aktivität wird den **Gingipainen**, einer Gruppe von Cystein-Endopeptidasen zugeschrieben (Imamura 2003). Es existieren dabei zwei Gruppen, jene mit der Fähigkeit zur Hydrolyse von Lys-Xaa-Peptidbindungen

(Lys-Gingipain, Kgp) und solche für Arg-Xaa-Peptidbindungen (Arg-Gingipaine, Rgps). Die Rgp-Gruppe beinhaltet zwei Subtypen, HRgpA und RgpB. Bei Kgp und HRgpA handelt es sich um Polypeptid-Komplexe aus je einer katalytischen Domäne und einer Hämagglutinin/Adhäsion-Domäne. Letztere fehlt bei RgpB. Neben dieser groben Einteilung existieren durch zahlreiche posttranslationale Reifungsprozesse weitere Formen der einzelnen Enzyme (Imamura 2003, Travis et al. 1997). Etwa 80% der Gingipaine sind in membrangebundener Form auf der Zelloberfläche oder in Vesikeln zu finden, ein geringerer Teil wird sezerniert (Takii et al. 2005).

Die Proteasen dienen *P. gingivalis* vorwiegend zur Gewinnung kurzkettiger Peptide als Nährstoffe und zur Umgehung der Wirtsabwehr. Zunächst tragen daher besonders die Rgps zur Adhärenz des Keimes bei, indem Fimbrienbildung und bakterielle Koaggregation unterstützt werden (Kamaguchi et al. 2003). Ebenso werden kryptische Liganden auf Wirtszellen und Matrixbestandteilen freigelegt, was die Bindung an jene erhöht und zur Hämagglutination beiträgt (Hamada et al. 1998, Potempa et al. 2000). Obwohl Gingipaine einige Matrixbestandteile (Fibrinogen, Laminin, Kollagen Typen III-V) auch spalten können, fördert eher die Aktivierung wirtseigener Proteasen, der MMPs, die Zerstörung parodontalen Gewebes (DeCarlo et al. 1997, Pike et al. 1996, Potempa et al. 2000). Da *P. gingivalis* kein eigenes Eisenspeichersystem besitzt, nutzt er Hämin als Eisenquelle. Neben Hämin-bindenden Oberflächenproteinen und speziellen Hämolytinen tragen auch die Gingipaine über ihren Einfluss auf die Blutgerinnung zu dessen Bereitstellung bei (Holt et al. 1999, Lamont und Jenkinson 1998). So fördert HRgpA, in geringerem Maße auch RgpB, zwar die Blutgerinnung über eine unkontrollierte Thrombinbildung. Diese wird über die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IX und X, die Prothrombinaktivierung und einen Verbrauch von Protein C erreicht (Imamura et al. 2001). Dagegen baut Kgp aber die α -Kette des Fibrinogen-Moleküls ab, wodurch dieses nicht mehr polymerisieren kann. Letztes überwiegt und sorgt für die lokale Blutungsneigung des parodontalen Gewebes bei Infektionen mit *P. gingivalis* (Imamura et al. 1995, Potempa et al. 2000). Durch die Thrombin-Freisetzung wird indirekt jedoch eine stark pro-inflammatorische Wirkung, unter anderem mit Osteoklasten-Aktivierung, erzielt (Imamura et al. 2001). Eine ähnliche Wirkung resultiert aus der vorwiegend RgpB-induzierten Aktivierung von Präkallikrein und der allgemein Gingipain-bedingten direkten Freisetzung von Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen (Imamura et al. 2003).

Ebenso vielschichtig sind die Einflüsse auf das Immunsystem des Wirtes. Niedrige Konzentrationen, vor allem von HRgpA, können die Faktoren C3, C4, C5 und den C1-

Komplex des Komplementsystems aktivieren. Erhöhte Konzentrationen an Gingipainen bauen diese Faktoren jedoch vollständig ab und hemmen so die Komplementaktivierung (Popadiak et al. 2007). Kgp und HRgpA sind zudem in der Lage, den C5a-Rezeptor auf PMNs zu zerstören (Jagels et al. 1996). Auch das Cytokinnetzwerk unterliegt diesem fein abgestimmten Wirkmechanismus der Proteasen. So führen niedrige Konzentrationen von Rgp und Kgp das IL-8 zwar zunächst in eine aktivere Form über, bei höherer Konzentration erfolgt jedoch der vollständige Abbau (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998). Ähnliches gilt für IL-6, welches vorwiegend von Kgp abgebaut wird (Banbula et al. 1999) und für TNF- α (Calkins et al. 1998). Auch der Abbau von Interferon- γ und die Induktion anti-inflammatorischer Cytokine (IL-1ra, IL-4) unterliegen den Gingipainen (Potempa et al. 2000). Wie anderen Virulenzfaktoren des Keimes, lösen Gingipaine zudem eine Ak-Produktion (vorwiegend IgG) aus (Gibson et al. 2005). Im Gegensatz dazu ist jedoch ihre Fähigkeit zur Spaltung der Immunglobuline G (Abb. 1) und A bekannt. (Jansen et al. 1994, Cutler et al. 1993, Grenier et al. 1989, Vincents et al. unveröffentlicht).

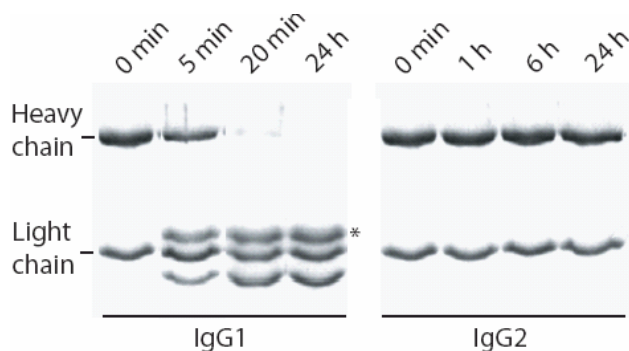


Abb. 1: Western Blot mit sichtbarer Spaltung der schweren Kette (heavy chain) von IgG1, nicht jedoch IgG2, binnen 24-stündiger Inkubation mit Gingipain K (Vincents et al. unveröffentlicht)

Weiteren Proteasen von *P. gingivalis*, etwa PrtT-Proteinase, Periodontain und Tpr-Proteinase, wird eher unspezifische proteolytische Aktivität zugeschrieben. Sie dienen der Gewinnung von kurzkettigen Peptiden durch den Abbau vorverdauter Proteine. Periodontain nimmt über die Inaktivierung des α 1-Proteinase-Inhibitors und Gewebsinhibitoren der MMP's Anteil an der Zerstörung des Zahnhalteapparates. Auch wird eine echte Kollagenase von *P. gingivalis* gebildet (Nelson et al. 1999, Birkedal-Hansen et al. 1988, Potempa et al. 2000).

P. intermedia

Die Gattung Prevotella wurde von den Bacteroides abgegrenzt. Sie zeichnet sich durch gramnegative, unbewegliche und mäßig saccharolytische Stäbchen aus (Shah und Collins 1990). Als strikter Anaerobier ist der Keim regelmäßig im Gastrointestinaltrakt und dem

gingivalen Sulkus zu finden (Santos et al. 2007). Während seine nächsten Verwandten mit parodontaler Gesundheit assoziiert sind, gilt *P. intermedia* eher als parodontopathogen, obwohl er auch bei diesbezüglich gesunden Personen nachgewiesen werden kann. Sein pathogenes Potential zeigt sich zudem bei intraabdominellen Infektionen, solchen der Atemwege, der Haut und verschiedenen odontogenen Entzündungen. Eine Person ist dabei meist Träger mehrerer Genotypen (Mättö et al. 1997, Marsh und Martin 2003, Socransky et al. 1998).

Als Brückenkeim trägt er unter anderem durch Mannose-reiche Exopolysaccharide zur Biofilmbildung bei. Diese Substanzen bieten zudem einen Phagozytoseschutz (Yamanaka et al. 2009). Auch Fimbrien dienen der Adhärenz des Bakteriums. Es existieren jedoch stammesspezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion (Leung et al. 1989). Generell konnte die Fähigkeit zur Bindung an gingivale Epithelzellen und Fibroblasten (Alugupalli und Kalfas 1995), sowie Bestandteile aus Plasma und extrazellulärer Matrix (Alugupalli et al. 1994) nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Adhärenz nutzt der Keim zelleigene Signalwege zur Invasion in Wirtszellen, darunter Gingivaepithelzellen und Endothelzellen (Dorn et al. 1998).

Als typischer schwarz-pigmentierter Anaerobier benötigt *P. intermedia*, ähnlich wie *P. gingivalis*, Eisen als essentiellen Wachstumsfaktor. Neben Fimbrien sorgen daher auch spezielle Hämagglutinine und das stark hämolytische Potential des Keimes für die Freisetzung von Hämoglobin und Hämin als wichtige Quellen des Elementes (Leung et al. 1996, Okamoto et al. 1999).

Weitere Membranbestandteile wie das LPS tragen durch Induktion proinflammatorischer Cytokine (IL-1 β) und Freisetzung von MMPs aus verschiedenen Zellen des Zahnhalteapparates zu dessen Zerstörung bei. (Guan et al. 2008, Sanderink et al. 2004a).

Bekannt ist *P. intermedia* jedoch auch für seine zahlreichen Proteasen. Da der Keim vorwiegend kurzkettige Peptide benötigt, besitzt er eine starke Dipeptidyl-Peptidase-Aktivität. Aber auch echte Proteinasen gehören zu seinen Virulenzfaktoren. Einige dieser Cysteinproteasen ähneln jenen der Arg-Gingipaine von *P. gingivalis*, zeigen jedoch schwächere Aktivität (Gazi et al. 1997). Der größte Teil der Proteasen ist auf der Zelloberfläche gebunden. Klinische Isolate von Patienten mit Parodontitis zeigen stärkeres proteolytisches Potential (Yanagisawa et al. 2006). Der Abbau von Wirtspoteinen ist zum einen mit der Eisengewinnung vergesellschaftet, wie der nachgewiesene Abbau von Transferrin, Haptoglobulin und Albumin zeigt (Jansen et al. 1997). Aber auch die Abwehr

des Wirtes scheint betroffen. Interpain A etwa zeigt Gingipain-ähnlichen Einfluss auf das Komplementsystem, indem es Faktor C3 erst aktiviert, später komplett spaltet. Wirtseigene Protease-Inhibitoren wie α 2-Makroglobulin werden inaktiviert (Potempa et al. 2009, Jansen et al. 1997). Auch die Immunglobuline sind betroffen. So wurde der komplette Abbau von IgA1, IgA2, IgG und IgM beschrieben (Jansen et al. 1994, Jansen et al. 1995, Kilian 1981). Für IgA1 scheint eine spezielle Protease zu existieren, welche in einem ersten Schritt zur Bildung freier, inaktiver Fab-Fragmente führt, die dem Keim zudem als Tarnung dienen (Frandsen et al. 1991). Auch ein Fc-Bindungsprotein gehört zu den Virulenzfaktoren von *P. intermedia* (Labbé und Grenier 1995)

Tannerella forsythia

Dieser Keim ist bislang die einzige Spezies des Genus *Tannerella*, welcher 2002 von den *Bacteroides* abgegrenzt wurde. Das gramnegative fusiforme Stäbchen ist strikt anaerob und unbeweglich (Sakamoto et al. 2002). Obwohl *T. forsythia* vorwiegend bei schweren und refraktären Formen der chronischen und aggressiven Parodontitis zu finden ist, können auch parodontal gesunde Personen, darunter 10-20% der Kinder, Träger des Keimes sein (Hamlet et al. 2004). Sein pathogenes Potential ist ebenso mit kardiovaskulären Erkrankungen und Abszessbildung assoziiert (Sabet et al. 2003).

Über die Virulenzfaktoren von *T. forsythia* liegen vergleichsweise wenig Informationen vor, wahrscheinlich aufgrund dessen schwieriger Kultur. Das anspruchsvolle Bakterium benötigt Hämin, Menadion, Cystein und N-Acetylmuraminsäure als Wachstumsfaktoren (Holt und Ebersole 2005). Somit profitiert *T. forsythia* von Mischkulturen wie dem dentalen Biofilm. Zu dessen Bildung trägt der Keim unter anderem durch eine Schicht aus Protein- und Glykoprotein-Untereinheiten (surface (S-) layer) bei. Diese dient der Adhärenz, der Invasion in Epithelzellen sowie der Hämagglutination. Zudem besitzt es ein stark antigenes Potential, was die Bildung von Immunglobulinen, vorwiegend IgG, induziert (Sabet et al. 2003). Von mehreren vermuteten Adhäsinen wurde das BspA-Protein intensiver untersucht. Es fördert die Adhäsion an Epithelzellen, Fibronectin und Fibrinogen sowie die Koaggregation mit Keimen wie *F. nucleatum* (Onishi et al. 2008, Inagaki et al. 2006, Sharma et al. 2005). Darüber hinaus ist BspA an der Freisetzung proinflammatorischer Cytokine aus Wirtszellen beteiligt, wozu auch die Lipopolysaccharide und Lipoproteine von *T. forsythia* beitragen (Hajishengallis et al.

2002). Das Lipoprotein BfLP löst zudem in höheren Konzentrationen die Apoptose von Gingivafibroblasten, Monocyten, Makrophagen und Epithelzellen aus (Hasebe et al. 2004).

Auch ein stark proteolytisches Potential ist maßgeblich an der Virulenz von *T. forsythia* beteiligt ist (Holt und Ebersole 2005). Zum einen konnten zwei oberflächenassoziierte Serinproteasen mit Trypsin-ähnlicher Aktivität nachgewiesen werden. Diese Endopeptidasen sorgen für eher unspezifischen Abbau von Proteinen (Potempa et al. 2000). Die prtH-Protease, eine Cysteinprotease, wurde an der Zelloberfläche der meisten klinischen Isolate gefunden und korreliert positiv mit vermehrtem Attachmentverlust. Sie dient neben der Hämolyse dem Abbau verschiedener Proteine und Glykoproteine. Auch die Modifikation humaner bioaktiver Peptide wird diskutiert (Saito et al. 1997, Hamlet et al. 2008). Eine weitere wichtige Protease ist eine Sialidase, welche durch das siaHI-Gen codiert wird. Sie spaltet N-Acetylmuraminsäure von Glykoproteinen oder Glykolipiden ab. Neben der Bereitstellung dieses Wachstumsfaktors wird so zur Zerstörung wirtseigenen Gewebes und der Störung dessen Abwehrmechanismen beigetragen (Ishikura et al. 2003). Als weitere Enzyme wurden mindestens acht Glucosidasen nachgewiesen. Sie bauen komplexe Oligosaccharide ab oder spalten solche von Glykoproteinen, was deren Funktion beeinträchtigt. Ähnliche Enzyme im Darm verhelfen entsprechenden Keimen zur Invasion durch Abbau von Mucinen, Proteoglykanen und Immunglobulinen (Hughes et al. 2003).

Treponema denticola

Die Gattung *Treponema* ist den oralen Spirochäten untergeordnet. Diese schmalen gramnegativen, obligat anaeroben Bakterien sind korkenzieherartig gewunden und verfügen über Flagellen, welche ihnen eine aktive Beweglichkeit verleihen (Sanderink et al. 2004a, Holt und Ebersole 2005). Zusammen mit anderen Vertretern wie *T. vincentii* und *T. socranskii* steht er in starkem Zusammenhang mit schwerer chronischer und aggressiver Parodontitis, aber auch nekrotisierenden Formen von Parodontalerkrankungen und Abszessen des Parodonts. Die Zahl und Vielfalt dieser Keime steigt dabei mit zunehmender Taschentiefe an. Bei diesbezüglich gesunden Individuen ist *T. denticola* nur selten und in geringen Mengen nachweisbar (Kigure et al. 1995, Ellen und Galimanas 2005).

Der Keim ist in der Lage, an die Zahnoberfläche, Wirtszellen und Bestandteile der EZM zu binden. Ebenso profitiert er von der Koaggregation mit anderen parodontopathogenen

Bakterien, vor allem *F. nucleatum*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* (Holt und Ebersole 2005). Das Leucin-reiche LrrA-Protein etwa vermittelt Protein-Protein-Interaktionen, darunter die Bindung an Epithelzellen und die Koaggregation mit *T. forsythia* (Ikegami et al. 2004). Msp, das Haupt-Oberflächen-Protein, dient nicht nur als Adhäsion, sondern besitzt durch seine Porin-Aktivität auch cytotoxisches Potential gegen Epithelzellen (Ishihara und Okuda 1999). Zur Eisengewinnung bildet *T. denticola* das Hämolyysin Cystalysin und Hämin-bindende Proteine (HbpA und HbpB). Dabei wirkt Cystalysin nicht nur auf Erythrocyten, sondern auch auf andere Wirtszellen cytotoxisch. Des Weiteren schwächt es die Abwehr durch Spaltung der Disulfidbrücken von Immunglobulinen, Cytokinen, Chemokinen und Glutathion (Chu et al. 1999). Derartige Eingriffe in das immuno-inflammatorische System des Wirts gehen auch von anderen Virulenzfaktoren aus. Die Lipide der Außenhülle entsprechen chemisch zwar eher der LTS grampositiver Bakterien, ähneln funktionell jedoch dem LPS gramnegativer Erreger. Zusammen mit Lipooligosacchariden und Lipoproteinen der Außenhülle induzieren sie die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine und MMPs aus Wirtszellen (Ishihara und Okuda 1999, Sanderink et al. 2004a). Das immunsuppressive Protein (Sip) des Keims stört zudem die Proliferation von Lymphozyten oder leitet deren Apoptose ein (Lee et al. 2004).

Die proteolytischen Eigenschaften des Keimes sind mannigfaltig und wurden vielfach untersucht. So gehören zahlreiche Peptidasen zu den Enzymen von *T. denticola*, darunter Prolyl-spezifische Peptidasen. Diese Trypsin-ähnlichen Peptidasen dienen neben der Versorgung mit kurzkettigen Peptiden und Aminosäuren dem Eingriff in das Abwehrsystem des Wirtes. So beeinflussen sie die Bildung und Funktion von vasoaktiven Substanzen, Hormonen, Neuropeptiden und anderen bioaktiven Peptiden (Potempa et al. 2000, Fenno et al. 2001). Darüber hinaus verfügt *T. denticola* über echte Proteinasen. Eine Chymotrypsin-ähnliche Proteinase der Zelloberfläche, Dentilisin oder auch Trepolisin genannt, ist besonders intensiv untersucht worden. Es handelt sich dabei um einen Protein-Komplex aus 3 Untereinheiten (Potempa et al. 2000). Die proteolytische Domäne ist an der Reifung von Membranbestandteilen beteiligt und kann Oberflächenproteine von Wirtszellen modifizieren, was etwa zur Freilegung kryptischer Epitope führt (Ishihara und Okuda 1999). Dies vermittelt die Adhärenz an Epithelzellen und die Penetration des Epithelverbandes (Chi et al. 2003). Der Abbau von Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin (Grenier et al. 1990), Transferrin, Gelatin und Fibrinogen (Uitto et al. 1988) betont die wichtige Rolle beim Eintritt von *T. denticola* in tiefere Gewebsschichten. Eine Interaktion

von Dentilisin und den Fimbrien von *P. gingivalis* scheint deren Koaggregation zu vermitteln (Hashimoto et al. 2003). Über den Abbau bioaktiver Peptide wie Substanz P, Angiotensin II, Bradykinin (Mäkinen et al. 1995), IL-8 (Deng et al. 2001) und die Aktivierung von IL-1 β (Potempa et al. 2000) wird der Eingriff in das Abwehr- und Entzündungsgeschehen des Wirtes deutlich. Uitto et al (1988) beschreiben zudem den Abbau von IgG und IgA sowie dem Proteinaseinhibitor α_1 -Antitrypsin. Ein Abbau von IgG und IgA konnte jedoch weder von Jansen et al. (1994) noch von Hollmann und Van der Hoeven (1999) bestätigt werden.

2.5 Immunglobuline als Teil des parodontalen Abwehrsystems

Am dento-gingivalen Übergang wird die Integrität der Körperoberfläche durch Zahnhartsubstanz durchbrochen. Somit stellt der gingivale Sulkus für das Immunsystem eine enorme Herausforderung dar (Hellwig et al. 2003).

Saum- und orales Sulkusepithel dienen dabei durch die Anheftung an die Zahnoberfläche und eine hohe Zellumsatzrate als wichtige Barriere für exogene Noxen. Zudem besitzen ihre Zellen eine limitierte Phagocytoseaktivität und können proinflammatorische Cytokine, antimikrobielle Peptide (β -Defensine), MMPs sowie Chemotaxine freisetzen, was die Entzündungsreaktion tieferer Gewebsschichten fördert (Pöllänen et al. 2003, Delima und Van Dyke 2003). Mit diesen Funktionen bilden sie einen wichtigen Teil des unspezifischen Abwehrsystems. Hierzu gehören des weiteren Monozyten, Makrophagen, Granulocyten und NK-Zellen. Die häufigsten Vertreter dieser Gruppe sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). Neben der Phagozytose sind sie zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoff-Molekülen, Cytokinen, Enzymen (darunter Elastase) und antimikrobiellen Substanzen, etwa Lysozym und Lactoferrin, fähig. Ihr stark proinflammatorisches Potential trägt jedoch erheblich zur Schädigung des Parodonts bei. Des Weiteren bilden Makrophagen durch Antigenpräsentation eine Schnittstelle zur spezifischen Abwehr (Pöllänen et al. 2003, Sanderink et al. 2004b).

Auch das Komplementsystem ist Bestandteil des Immunsystems. Dieser Komplex aus mehreren Plasmaproteinen führt über eine enzymatische Kaskade zur Bildung eines lytischen Komplexes, welcher auf Bakterienoberflächen bindet. Zudem werden Opsonine (Faktor C3b), Chemotaxine und Anaphylatoxine (Faktoren C3a, C4a, C5a) freigesetzt (Sanderink et al. 2004b, Löffler 2003).

Die spezifische Immunantwort schließlich wird von B- und T-Lymphozyten beherrscht. Letztere dienen der zellulären Abwehr. Nach Interaktion ihrer T-Zell-Rezeptoren mit Antigen-präsentierenden Zellen können drei Arten von T-Zellen gebildet werden. T-Helferzellen aktivieren Makrophagen und B-Lymphozyten. Zytotoxische T-Zellen setzen Toxine frei, welche vorwiegend entartete oder Virus-befallene Zellen abtöten. T-Suppressorzellen schließlich wirken regulierend auf das Abwehrgeschehen. B-Zellen dagegen sind Teil des humoralen Systems und tragen Ig-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Diese binden Antigene, welche daraufhin internalisiert, verdaut und über MHC-II-Proteine auf der Zelloberfläche den T-Helferzellen präsentiert werden. Jene sorgen daraufhin für die Umwandlung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche in hohem Maße Antikörper produzieren. Bestimmte Antigene, darunter Kohlenhydrate und bakterielle Strukturen, können auch auf direktem Wege B-Zellen aktivieren. Neben Plasmazellen entstehen zudem in beiden Fällen Gedächtniszellen, welche nach erneutem Antigenkontakt sofort passende Antikörper produzieren (Löffler 2003, Silbernagel und Desopoulos 2003).

Antikörper, oder **Immunglobuline**, sind Antigen-bindende Glykoproteine und gehören zur γ -Globulinfraktion des Blutplasmas. Der Mensch besitzt fünf Ig-Klassen, deren individuelle Bildung durch die Natur des Antigens, dessen Eintrittspforte und Milieubedingungen beeinflusst wird (Jefferis 1990b). Die gemeinsame strukturelle Grundeinheit (siehe Abb. 2) besteht aus vier Peptidketten, darunter je zwei identische leichte (L-) und schwere (H-) Ketten. Letztere tragen zudem einen Polysaccharidrest. Die N-terminal gelegenen Abschnitte beider Ketten zeichnen sich durch extreme Variabilität aus und werden demzufolge als V_L - bzw. V_C - Domäne bezeichnet. Die übrigen Teile der Peptidketten setzen sich aus konstanten Regionen zusammen, den C_L - und C_H -Domänen. Die Quartärstruktur des gesamten Moleküls erscheint Y-förmig, wobei die identischen Schenkel als Fab-Fragmente bezeichnet werden. Sie setzen sich aus beiden Ketten zusammen und enthalten N-terminal deren variable Regionen, welche so die Antigen-bindenden Fragmente der Immunglobuline bilden. Damit besitzt jede Ig-Grundeinheit zwei gleiche Antigenbindungsstellen. Die C-terminalen Abschnitte der H-Ketten bilden das so genannte Fc-Fragment, welches für die biologische Aktivität des Antikörpers zuständig ist. Gemeinsames Bindeglied der Peptidketten sind Disulfidbrücken in der so genannten Hinge-Region. Sie verleiht dem Antikörper zudem eine gewisse Flexibilität (Hofmann 2001a, Hirsch-Kauffmann und Schweiger 1987).

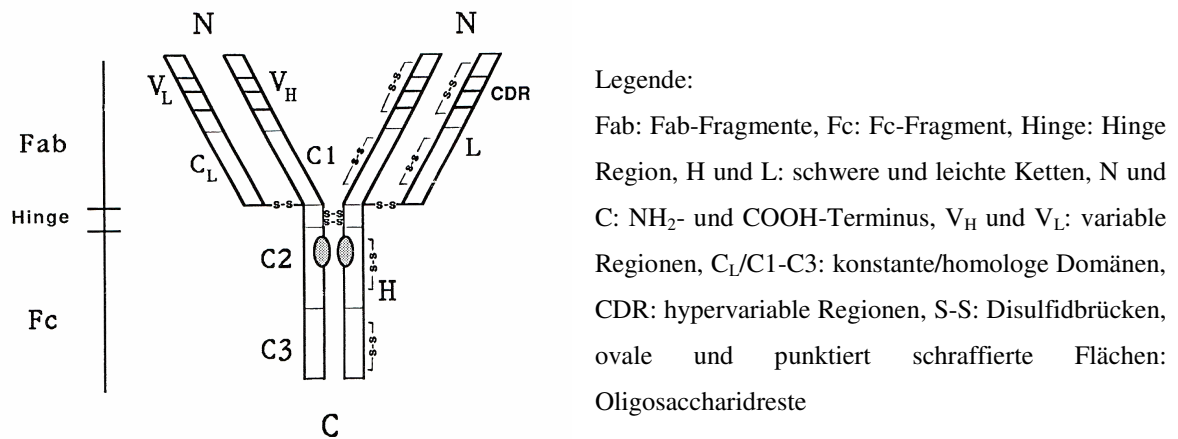


Abb. 2: Grundeinheit der Immunglobuline (Nezlin 1998)

Da schier unzählige Antigene auf den Organismus einwirken, wird eine ebenso große Zahl an Antikörpern benötigt. Die zufällige Rekombination von insgesamt mehreren hundert beteiligten Genen sorgt daher schon bei der B-Lymphozytenreifung im Knochenmark für eine theoretische Anzahl von bis zu 10^8 verschiedenen Antikörpern. Erst jedoch der Kontakt mit dem Antigen sorgt schließlich für die klonale Expansion seines spezifischen B-Lymphozyten und die Produktion passender Immunglobuline. Da ein solches Antigen meist mehrere Epitope besitzt, werden entsprechend viele B-Zellen aktiviert. Alle daraufhin produzierten Antikörper binden das gleiche Antigen und sind damit polyklonal. Für Forschungszwecke (in vitro) können auch monoklonale, also Epitop-spezifische Antikörper selektiert werden (Löffler 2003).

Während für die leichte Kette zwei Isotypen (Ic χ und λ) existieren, gibt es beim Menschen neun Isotypen der schweren Kette (hc). Sie sind Grundlage der Ig-Klassen und Subklassen: Das **IgM** (hc μ) des Serums setzt sich aus fünf Ig-Grundeinheiten und einem Verbindungspeptid zusammen. Monomeres IgM hingegen bildet gemeinsam mit **IgD** (hc δ), ebenfalls einem Monomer, die membranständigen Ag-Rezeptoren auf B-Lymphozyten. Während für IgD keine weitere Funktion nachgewiesen wurde, ist IgM ein starker Aktivator des Komplementsystems. Als erst-gebildetes Ig einer Immunreaktion trägt es im Besonderen zur schnellen Elimination von Bakterien bei. Dieser Antikörper ist in Serumkonzentrationen von 0,7-1,7 g/l zu finden (Fridman 1997).

IgA besitzt zwei Subklassen. Während **IgA1** (hc $\alpha 1$) hauptsächlich im Serum verbleibt, wird das meist als Dimer vorliegende **IgA2** ($\alpha 2$) in den Epithelien mit einer sekretorischen Komponente versehen und an die Schleimhautoberfläche oder in Sekrete exokriner Drüsen abgegeben. Durch Aktivierung phagozytierender Abwehrzellen schützen beide Subklassen

vor mikrobieller Invasion. Durch seine kurze Halbwertszeit und Sekretion beträgt die Serumkonzentration von IgA nur 1,5-2,6 g/l, obwohl die Synthesemenge fast der von IgG entspricht (Fridman 1997, Netzlin 1998).

Nur Spuren sind hingegen von **IgE** (hc ϵ), einem monomeren Ig, im Serum nachweisbar. Allergene und Parasiten-Antigene können dessen Produktion jedoch extrem stimulieren. Durch Bindung an den Fc ϵ -Rezeptor auf Mastzellen und basophilen Granulozyten löst IgE deren Degranulation mit Freisetzung von Chemotaxinen, Histamin und anderen Entzündungsmediatoren aus, was vor allem eine allergische Genese bedingt. Aber auch eosinophile Granulozyten werden im Falle eines Parasitenbefalls zur Freisetzung toxischer Substanzen angeregt (Fridman 1997, Netzlin 1998).

Mit Abstand die häufigste Ig-Klasse setzt sich aus den vier Subklassen **IgG1-4** (hc γ 1-4) zusammen. Diese monomeren Antikörper machen zusammen 75% aller Immunglobuline des Serums aus, was einer Konzentration von 9,5-12,5 g/l entspricht. Sie werden zu späteren Phasen der Immunantwort (Zweitantwort) gebildet und können Epithelbarrieren, etwa jene der Plazenta, durchqueren. Auch extravasal sind sie präsent (Fridman 1997). Die für IgG spezifischen Fc γ -Rezeptoren (I-III) finden sich auf zahlreichen Effektorzellen, darunter Makrophagen, B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten (Kobayashi et al. 2000, Mohan 2001).

Bis zu 70% dieser Antikörperklasse werden von **IgG1** eingenommen. Es stellt den größten Immunschutz des Neugeborenen dar. Aber auch beim Erwachsenen erfüllt IgG1 als starker Aktivator des Komplementsystems sowie phagozytischer und cytotoxischer Effektorzellen eine wichtige Abwehrfunktion. Gebunden werden vorwiegend Peptid-Antigene. Starke funktionelle Ähnlichkeit besitzt die Subklasse **IgG3**, welche jedoch mit einem Anteil von 7% der IgG's weitaus weniger im Serum vertreten ist. **IgG2** hingegen ist mit 20% der zweithäufigste Subtyp und vorrangig für die Bindung von Kohlenhydrat-Antigenen zuständig. Allerdings ist es nur ein schwacher Komplement-Aktivator und bindet kaum Fc γ -Rezeptoren. Seine Bedeutung ist derzeit nicht ausreichend erforscht. Die letzte Subklasse, **IgG4**, ist gleichzeitig die seltenste (4% aller IgG's). Dieser Antikörper ist nicht an der Komplementaktivierung beteiligt und bindet an nur einen von insgesamt drei Fc γ -Rezeptortypen. Er scheint bei allergischen Reaktionen und der Regulierung von Ak-Aktivitäten beteiligt zu sein (Fridman 1997, Scott et al. 1990, Jefferis 1990a, Jefferis 1990b, Mohan 2001).

Eine besondere Abwehrkomponente des Parodonts stellt zudem die orale Sulkusflüssigkeit dar. Im Gesunden ist sie als Exsudat des subepithelialen Gefäßplexus anzusehen, welches durch Osmose in den Sulkus gelangt. Die Fließrate beträgt maximal 3-8 µl/h. Sie steigt bei Gingivitis und Parodontitis aber kontinuierlich an und kann Spitzenwerte von über 100 µl/h erreichen. Auch die Zusammensetzung entspricht dann eher einem entzündlichen Infiltrat (Pöllänen et al. 2003, Goodson 2003). So sind neben Plaquebakterien und Strukturzellen des Parodonts zahlreiche Abwehrzellen zu finden. 95% davon sind PMNs, daneben Makrophagen und Lymphozyten. Die humorale Zusammensetzung gleicht der des Blutplasmas und umfasst unter anderem Elektrolyte, Cytokine, Komplementfaktoren und Antikörper. Darüber hinaus sind zahlreiche bakterielle oder wirtseigene Enzyme und Toxine zu finden, wobei Proteasen von besonderer Bedeutung sind. Damit hat die GCF nicht nur eine mechanische Spül- und Abwehrfunktion, sondern auch hohes inflammatorisches Potential (Sanderink et al. 2004c, Uitto 2003, Uitto et al 2003, Delima und Van Dyke 2003). Die Levels der IgG-Subklassen in der Sulkusflüssigkeit von Parodontitispatienten variieren stark (Kilian 1981, Ebersole 2003, Booth et al. 2006).

2.6 Abbau von Peptiden und Proteinen

Peptide und Proteine nehmen unter anderem als Strukturproteine, Enzyme, Hormone, Transport- und Rezeptormoleküle 20% des menschlichen Körpergewichtes ein (Hofmann 2001c). Ihre Grundbausteine sind Aminosäuren, welche über die Peptidbindung (-NH-CO-) zu Ketten miteinander verbunden sind. Bei bis zu 100 verknüpften Aminosäuren spricht man von einem Peptid, darüber hinaus von einem Protein. (Löffler 2003).

Die **Spaltung von Peptidbindungen (Proteolyse)** erfolgt durch Reaktion mit Wasser, also hydrolytisch. Die entsprechenden Enzyme, Proteasen und Peptidasen, gehören daher zu den Hydrolasen. Sie sind ebenso allgegenwärtig wie die Proteine selbst. Peptidasen sind dabei eher unspezifisch hinsichtlich ihres Substrates und erzeugen kleine Peptidstücke oder Aminosäuren, während Proteasen oft hochspezifisch dem limitierten Abbau größerer Proteine dienen. Verallgemeinernd wird jedoch auch oft nur der Begriff Peptidase verwendet (Hasilik 2007, Hofmann 2001d).

Eine Einteilung der Enzyme kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen. So spalten Endopeptidasen nur Peptidbindungen im Inneren eines Proteins, während Exopeptidasen die N- oder C-terminalen Aminosäuren abtrennen. Man spricht dabei

entsprechend von Amino- oder Carboxypeptidasen. Sehr kurze Peptidketten werden von Di- und Tripeptidasen gespalten (Hofmann 2001b).

Auch existiert eine Klassifizierung nach der Beschaffenheit des katalytischen (aktiven) Zentrums und damit dem Katalysetyp von Peptidasen. Diese Einteilung umfasst Aspartatpeptidasen, Cysteinpeptidasen, Glutamatpeptidasen, Metallopeptidasen, Serinpeptidasen, Threoninpeptidasen und Peptidasen unbekannten Katalysetyps. Zur großen Gruppe der Serinpeptidasen gehören zahlreiche Prohormonconvertasen, Verdauungsenzyme, Leukozytenenzyme, Gerinnungsfaktoren und bakterielle Proteasen (Hasilik 2007, Potempa et al. 2000). Unter den Metallopeptidasen finden sich vor allem die MMPs. Sie sind Hauptenzyme des Abbaus der extrazellulären Matrix und von Zelladhäsionsmolekülen (Hasilik 2007, Uitto et al. 2003). Unter den Cysteinpeptidasen schließlich sind lysosomale Kathepsine, an der Apoptose beteiligte Caspasen und Gingipaine zu finden (Hasilik 2007, Potempa et al. 2000).

Da eine unkontrollierte Proteolyse die Gefahr des Selbstverdaus aller Gewebe birgt, unterliegt sie zahlreichen Kontrollmechanismen. Wie bei anderen Enzymen spielt schon das Milieu mit Temperatur und pH-Wert eine wichtige Rolle (Hofmann 2001d). Ein weiterer Schutzmechanismus ist die Freisetzung der Peptide als Enzymvorstufen (Zymogene). Diese enthalten meist Sequenzen (Propeptide), welche ihr aktives Zentrum blockieren. Erst deren Abspaltung durch anders- oder gleichartige Enzyme führt zur Aktivierung (Hofmann 2001b). Von essentieller Bedeutung sind aber auch die vielen Inhibitoren der verschiedenen Peptidasen. Unter Laborbedingungen sind zahlreiche chemische Verbindungen für einzelne Peptidasen bekannt (Rassow 2008). Im Körper selbst bieten natürliche Proteaseinhibitoren Schutz. So wird die extrazelluläre Matrix durch bestimmte Inhibitoren der MMP's, die TIMPs, geschützt (Deutzmann et al. 2007). Proteaseinhibitoren des Blutplasmas bieten Schutz vor Infektionen, vor Entzündungen und sind Regulatoren der Blutgerinnung. 93% entfallen dabei auf α 1-Antitrypsin und α 2-Makroglobulin. Schädigendes Potential für den Menschen bringen dagegen bakterielle Inhibitorproteine, welche häufige Virulenzfaktoren darstellen (Hoffmann 2001b).

3 Ziele der Arbeit

Einige parodontopathogene Bakterien sind in der Lage, Immunglobuline, einen wichtigen Teil des spezifischen Abwehrsystems, abzubauen. Die häufigste Immunglobulin-Klasse des Menschen ist IgG, etwa 70% davon entfallen auf die Subklasse IgG1. Für *P. gingivalis* ist bekannt, dass dessen Virulenzfaktor Gingipain K (Kgp) hochspezifische proteolytische Aktivität gegen IgG1 besitzt. Auch die Spaltstelle in der schweren Kette des Moleküls konnte aufgezeigt werden.

Bisher wurden vorwiegend In-vitro-Untersuchungen, bei welchen Zellen der Bakterien, deren Kulturüberstände oder einzelne Enzyme mit verschiedenen IgG-Präparaten inkubiert wurden, durchgeführt. Zumeist wurden Subklassen des Antikörpers dabei nicht berücksichtigt. In-vivo-Untersuchungen sind zu diesem Thema so gut wie nicht vorhanden. Ebenso wurde der Einfluss einzelner Virulenzfaktoren nicht berücksichtigt.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher herauszufinden, ob der Abbau von IgG1 in der gingivalen Sulkusflüssigkeit von Bedeutung ist und inwieweit er mit *P. gingivalis* sowie dessen Protease Kgp in Verbindung gebracht werden kann. Entsprechend der Natur der Parodontitis als Mischinfektion sollte zudem herausgefunden werden, welchen Einfluss die stark parodontopathogenen Erreger *T. forsythia*, *T. denticola* und *A. actinomycetemcomitans* hinsichtlich des IgG1-Abbaus haben. Auch der stark proteolytische und mit Parodontitis assoziierte *P. intermedia* sollte berücksichtigt werden.

Hinweise auf Unterschiede bezüglich der IgG-Subklassen sollten durch gleichzeitige Detektion von IgG2 und dessen Spaltstücken aufgedeckt werden.

Des Weiteren dient der Vergleich von Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis dazu, eventuelle Unterschiede bezüglich des Antikörperabbaus zwischen den beiden Krankheitsformen zu erkennen. Auch der Einfluss der Sondierungstiefe sollte untersucht werden.

Zum quantitativen Nachweis von Gingipainen in der Sulkusflüssigkeit wurden bis dato meist Versuchsanordnungen genutzt, welche auf einer Aktivitätsmessung beruhen. Diese besitzen jedoch nur eingeschränkte Spezifität. Die Konzentration von RgpB wurde bereits mittels hochspezifischem ELISA gemessen. Dieses sollte nun auch für Kgp erfolgen.

4 Material und Methode

4.1 Auswahl der Probanden

An der vorliegenden Studie nahmen insgesamt 23 Personen teil. Es handelte sich dabei um neun Patienten mit aggressiver Parodontitis (AP) sowie neun Patienten mit chronischer Parodontitis (CP). Alle gehörten zum Patientenkontingent der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde, Abteilung Parodontologie, an der Zahnklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Als Kontrollgruppe wurden fünf parodontal gesunde Personen ausgewählt. Es handelte sich dabei um Studenten der Zahnmedizin.

Die Studie war vor Untersuchungsbeginn von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt worden. Die Patienten sind im Vorfeld mündlich und mittels eines Informationsblattes über die Untersuchung aufgeklärt worden.

Die Diagnosen für AP und CP wurden nach der Einteilung des „International Workshop for a Classification System of Periodontal Diseases and Conditions“ aus dem Jahr 1999 (Armitage 1999) gestellt.

Patienten mit AP sollten die folgenden Symptome aufweisen:

- radiographisch nachweisbarer Knochenabbau $\geq 50\%$ an mindestens zwei verschiedenen Zähnen
- ≥ 5 mm Attachmentverlust an mindestens drei verschiedenen Zähnen, ausgenommen den ersten Molaren und Inzisivi
- Alter ≤ 35 Jahre zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns

Die Patienten mit CP hatten dagegen diese Kriterien erfüllt:

- Attachmentverlust von ≥ 5 mm an mehr als 30% der Zähne
- Alter ≥ 35 Jahre bei Krankheitsbeginn

In beiden Gruppen sollten dabei pro Patient mindestens 20 noch erhaltene Zähne und ≥ 10 Messpunkte mit einer ST von > 5 mm vorhanden sein. Alle Patienten durften keinerlei schwerwiegende systemische Erkrankungen, wie etwa Diabetes mellitus, Krebsleiden oder koronare Herzkrankheit, welche nachweislich Einfluss auf die parodontale Situation haben können, aufweisen. Aus gleichen Gründen waren Antibiotikatherapie (zum Zeitpunkt der Probenentnahme und bis zu sechs Monate davor) sowie Schwangerschaft und Stillzeit Ausschlusskriterien. Aktive und ehemalige Raucher wurden nicht zur Studie herangezogen.

Bei den Probanden der Kontrollgruppe durfte die maximale Sondierungstiefe an allen Zähnen 3 mm nicht überschreiten. Die weiteren, den systemischen Zustand betreffenden Voraussetzungen entsprachen denen der Patientengruppen.

Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme alle in der Phase der Initialtherapie ihrer Parodontitisbehandlung. Das bedeutet, die Patienten hatten nach eingehender Anamnese und klinischer Befunderhebung mit Feststellung des Approximalraumblutungsindex (API), des Sulkusblutungsindex (SBI), des Parodontalen Screening Index (PSI) und eines Röntgenstatus durch den behandelnden Zahnarzt bereits Mundhygieneinstruktionen und professionelle Zahnreinigungen mit supra- und subgingivalem Scaling erhalten. Bei keinem war jedoch eine handinstrumentelle Glättung der Wurzeloberfläche (Kürettage), chirurgische Therapie oder Antibiotikatherapie durchgeführt worden.

4.2 Klinische Untersuchung der Teilnehmer

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden als klinische Daten die Sondierungstiefe (ST) an sechs Stellen pro Zahn sowie die Blutung bei Sondierung (BoP) mit der Parodontalsonde PCPUNC15 (Hu Friedy, Leimen, Deutschland) gemessen. Letztere wurde als Quotient von positiven Zähnen pro Gesamtzahnzahl errechnet. Diese Messungen fanden aufgrund der eventuell damit verbundenen Blutung nicht am Tag der Probenentnahme statt.

4.3 Probenentnahme

Bei jedem Patienten wurden nach folgendem Schema sechs Messpunkte für die Entnahme der gingivalen Sulkusflüssigkeit ausgewählt, während es bei den gesunden Probanden nur zwei Entnahmestellen waren (Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der Proben je Patient und gesundem Probanden

		Oberkiefer			Unterkiefer		
Patient	ST [mm]	≤ 3,5	4-5,5	≥ 6	≤ 3,5	4-5,5	≥ 6
	Probe	a	b	c	x	y	z
gesunder Proband	ST [mm]	≤ 3			≤ 3		
	Probe	a			b		

Die einzelnen Entnahmestellen wurden dabei so gewählt, dass sie nicht direkt aneinander grenzten. Watterollen dienten der Fernhaltung des Speichels vom Sulkus. Die eigentliche Spülung wurde mit Hilfe einer Mikropipette (Reference[®] (variabel), 0,5-10 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und Geloader[®] Tips (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Um das Lumen zu erweitern, wurde die Spitze der Tips eingekürzt. Diese wurde dann etwa 1 mm weit in den Sulkus eingeführt und jede Tasche auf diese Weise 10-mal mit 10 µl steriler Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gespült. Die Flüssigkeit wurde nach der Abgabe in den Sulkus immer wieder aufgesaugt und in sterilen Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung folgte unverzüglich bei -20°C.

4.4 Detektion von IgG1 und IgG2 sowie deren Spaltstücken

Zum Nachweis des Vorkommens von IgG1 und IgG2 in den Proben, sowie deren Spaltprodukten im Falle eines Abbaus durch Proteasen, wurde das Immunoblot-Verfahren angewendet.

4.4.1 Prinzip

Für das Immunoblot-Verfahren werden die Bestandteile eines Proteingemisches, wie es die GCF darstellt, zunächst mittels Elektrophorese (SDS-PAGE) in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Zur Fixierung und Kozentrierung, werden sie anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Protein- oder Western Blot). Um ein bestimmtes Protein sichtbar zu machen, eignen sich immunologische Verfahren. Zum Nachweis von IgG1 und IgG2 wurde hier ein Fluoreszenzimmuntest verwendet, bei welchem ein mit alkalischer Peroxidase markierter Antikörper (Konjugat) eingesetzt wird. Dieser führt nach Zugabe eines Substrates an den Stellen, wo sich das gesuchte Protein auf der Membran befindet, zur Fluoreszenz und kann somit einen Film an eben diesen Stellen schwärzen. Anhand mitgeführter Molekulargewichts-Marker, welche auf der gefärbten Membran sichtbar werden, kann nun beim Vergleich von Film und Membran auf die Größe der gesuchten Moleküle geschlossen und im vorliegenden Fall die Spaltung der Immunglobuline nachgewiesen werden.

Da für jeden Patienten IgG1 und IgG2 zu untersuchen waren, wurden pro Versuchseinheit alle sechs Proben eines Patienten verarbeitet und identisch auf zwei Gele sowie folglich zwei Membranen aufgeteilt (Abb. 3).

4.4.2 Durchführung

Die Rezepturen zur Herstellung der Gele und Puffer sind dem Anhang zu entnehmen.

Vorbereitung der Gele und der Elektrophoresekammer

Für die Elektrophorese wurde Zubehör des Mini-PROTEAN[®] Electrophoresis Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kanada) verwendet. Zur Herstellung von zwei Polyacrylamidgelen wurden zunächst die Glasplatten (short plates und spacer plates, 1 mm) in die dafür vorgesehenen Rahmen (casting frames) gespannt.

Anschließend wurde das Trenngel (10%) hergestellt. Jeweils 4,5 ml der Lösung wurden sofort zwischen die Glasplatten gegeben und vorsichtig mit ca. 2 ml A. dest. übergossen, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Die Härtung erfolgte bei 37°C über 30 min.

Die Herstellung des Sammelgels (4%) erfolgte nach Ablauf dieser Härtezeit. Das Wasser wurde daraufhin von den Trenngelen abgegossen und der Spalt zwischen den Glasplatten mit der Sammelgellösung aufgefüllt sowie ein Kamm (comb, 10 well, 0,75 mm) zur Bildung der Auftragstaschen eingesetzt. Das Trenngel polymerisierte binnen 1 h bei 37°C.

Danach konnten die Glasplatten mit den Gelen aus den Rahmen entnommen und nach Herstellerangaben in die Mini-PROTEAN[®] 3 cell eingespannt werden. Zum Schluss wurden die dafür vorgesehenen Kammern mit Kathoden- bzw. Anodenpuffer gefüllt. Zum besseren Auftragen der Proben wurden die Auftragstaschen der Gele noch mit Kathodenpuffer gespült, wozu eine handelsübliche Einmalspritze samt Kanüle benutzt wurde.

Vorbereitung der Proben, des Standards und des Molekulargewichts-Markers

Von jeder Probe wurden 18 µl Flüssigkeit entnommen und in ein Eppendorf-Tube pipettiert. Um die vorhandenen IgG-Moleküle in den Proben vor weiterem Abbau durch in der Sulkusflüssigkeit vorhandene Proteasen zu schützen und damit die In-vivo-Situation darstellen zu können, wurde jeweils der Proteaseninhibitor FFRck (Bachem Biosciences Inc., Philadelphia, USA) in der Verdünnung 1:100 (18 µl Sulkusflüssigkeit + 2 µl 10% FFRck / A. dest.) zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden in jedes Tube 20 µl des nicht reduzierenden Probenpuffers A pipettiert. Um die Proteine auszufällen, wurde das Gemisch danach für 5 min bei 99°C erhitzt und wegen des entstandenen Kondenswassers kurz zentrifugiert. Nach diesem Schritt konnten 13,4 µl des reduzierenden Probenpuffers B hinzugegeben werden. Es folgten erneutes Erhitzen für 2 min bei 99°C und kurzes Zentrifugieren.

Als Referenz diente ein Standard-IgG (HUMAN IgG, 1 mg/ml, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). Dafür wurde die handelsübliche Lösung 1:100 in A. dest. verdünnt und davon wiederum 20 µl genauso wie das Proben-FFRck-Gemisch weiter für die Elektrophorese aufbereitet. Zur späteren Feststellung der Molekulargewichte kam der Unstained SDS PAGE Marker 6,5-200 kDa, liquid mix (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) zum Einsatz. Pro Gel wurden 5 µl verwendet und vor dem Auftragen kurz bei 99°C erhitzt.

Elektrophorese

Die so vorbereiteten Proben, Standard-Immunglobulin und Molekulargewichts-Marker wurden sofort in die Auftragstaschen der Elektrophoresegele gegeben. Das Pipettierschema für einen Patienten sah wie folgt aus (Abb. 3):

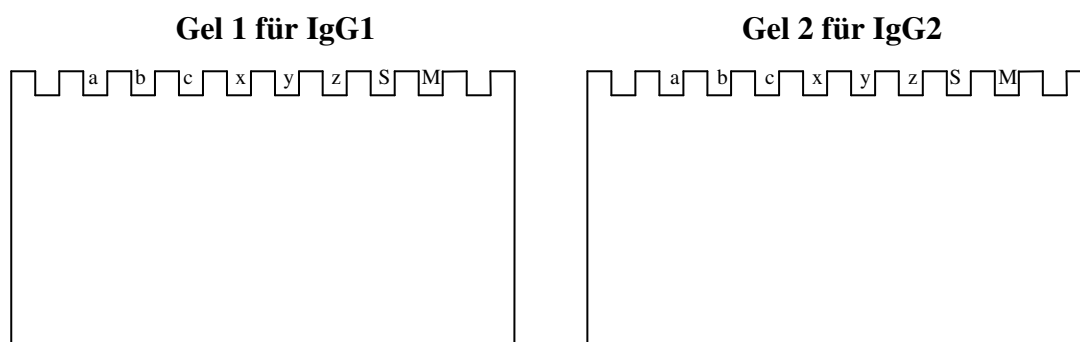


Abb. 3: Verteilung der Proben (a,b,c,x,y,z), des Standard-IgG (S) und des Molekulargewichts-Markers (M) auf die Gele

Um alle Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zu konzentrieren, wurde zunächst eine Spannung von 30 V angelegt, bis die Bromphenolblau-Front die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Anschließend liefen die Proben für ca. 150 min bei 80 V bis die Bromphenolblau-Front am unteren Ende des Trenngels stand.

Western Blot

Für den Protein-Blot kam die Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kanada) zum Einsatz. Die Gele wurden dazu aus den Glasplatten entnommen und nach folgendem Sandwich-Prinzip (Abb. 4) zusammen mit Vlies, Filterpapier und der Nitrocellulose-Membran (NC 45, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in die zugehörigen Gelhalter-Kassetten eingebracht:

Anodenseite:	Vlies
	3 Filterpapiere
	Nitrocellulose-Membran
	Gel
	3 Filterpapiere
Kathodenseite:	Vlies

Abb. 4: Sandwich-Prinzip für den Elektrotransfer

Bei der Schichtung war auf stete Bedeckung mit Transferpuffer zu achten, um Lufteinschlüsse zu verhindern. Nach dem Einbringen beider Kassetten in die Transferbox wurde die zugehörige Eis-Einheit eingelegt und die Box mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 30 V in einem Kühlraum mit 4°C.

Immunreaktion

Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurden die Membranen zunächst aus den Kassetten entnommen, in abdeckbare Gefäße mit Blockpuffer gelegt und über 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach Abgießen des Blockpuffers konnte der erste Antikörper (Mouse Anti-Human IgG1 bzw. Mouse Anti-Human IgG2, Zymed[®] Laboratories, South San Francisco, Kanada) zugegeben werden, welcher spezifisch die gesuchten IgG-Moleküle (hier als Antigene fungierend) bindet. Dafür wurden pro Membran 4 ml Ak-Puffer und 4 µl der jeweiligen Ak-Lösung gemischt, auf die Membranen gegeben und 3 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert.

Es folgte ein Abspülen der Membranen und anschließend dreimaliges Waschen für jeweils 20 min unter leichtem Schütteln mit dem Waschpuffer.

Die so gereinigten Membranen wurden danach mit dem zweiten Antikörper (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/ HRP, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) behandelt. Pro Membran wurden dabei auf 4 ml Ak-Puffer 2 µl der Ak-Lösung gegeben. Die Inkubation erfolgte wie beim ersten Antikörper.

Es folgte erneutes Abspülen und dreimaliges Waschen der Membranen mit Waschpuffer.

ECL-Reaktion und Filmentwicklung

Für die Erzeugung der Fluoreszenz wurden die Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurden für jede Membran (etwa 5 x 7 mm) 1 ml Lösung A mit 25 µl Lösung B gemischt und auf der Membran verteilt.

Diese wurde danach in einer Dunkelkammer bei Rotlicht durch Schwenken in der Luft angetrocknet und zwischen Klarsichtfolien in eine Röntgenkassette gelegt. Über die Folie wurde dann ein Film (KODAK BioMax XAR Film, KODAK Industrie, Cedex, Frankreich) platziert und die Kassette geschlossen. Je nach sichtbarer Fluoreszenz betrug die Belichtungszeit 30 bis 120 min.

Anschließend konnten die Filme in der Dunkelkammer durch Schwenken in Entwickler (MH 28 Rapid-Entwickler, Calbe Fotochemie GmbH, Calbe, Deutschland) und Fixierer (Ilford Rapid Fixer, Ilford Imaging, Großbritannien) fertig gestellt, mit A. dest gespült und getrocknet werden. Die Einwirkzeit des Entwicklers wurde bei sichtbarer Graufärbung des Filmes gestoppt.

Färben der Membranen

Zum Sichtbarmachen der Banden des Molekulargewichts-Markers mussten anschließend die Nitrocellulosemembranen gefärbt werden. Dafür lagen die Membranen kurz in einer Ponceau S-Lösung. Überschüssige Farbe wurde mit Wasser abgespült.

4.5 Nachweis der parodontopathogenen Keime

Als relevante parodontopathogene Keime sollten *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola* in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden. Dazu wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) im Real-time-Verfahren angewendet.

4.5.1 Prinzip

Die PCR ist ein Verfahren zur Detektion organismus-spezifischer DNA-Abschnitte. Somit ist es möglich, den Nachweis oder Ausschluss des Vorhandenseins eines bestimmten Organismus, z.B. eines Bakteriums, zu erbringen. Dazu wird in einem vorbereitenden Schritt DNA aus einer Probe, hier GCF, extrahiert. Anschließend kann mit Hilfe von spezifischen Primern, Nukleotiden und eines hitzestabilen Enzyms, der taq-Polymerase, der spezifische DNA-Abschnitt vervielfältigt werden (Kettenreaktion). Dadurch wird selbst in minimaler Konzentration vorliegende DNA für Nachweismethoden zugänglich. Bei der Real-time PCR wird dazu der Cyanin-Farbstoff Sybr[®] Green I eingesetzt. Dieser bindet an doppelsträngige DNA und erzeugt nach Anregung durch Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 470 \text{ nm}$ eine Fluoreszenz. Da diese Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge ansteigt, kann durch die bei $\lambda = 510 \text{ nm}$ eintretende Emission nach jedem Zyklus (in „Echt-Zeit“) eine Messung stattfinden. Auf diese Weise kann neben der qualitativen auch eine quantitative Aussage getroffen werden. Zusätzlich wird die Spezifität mittels Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR kontrolliert. Hierzu wird die doppelsträngige DNA unter steigender Temperatur zu Einzelsträngen aufgeschmolzen, der Farbstoff entweicht. Bei der für das gesuchte Amplifikat spezifischen Temperatur entsteht dabei ein typischer Peak in der Kurve.

4.5.2 Durchführung

DNA-Extraktion

Für die Isolierung der DNA wurden ca. 2,5 μl der Probenflüssigkeit und das Komplettsset Genomic Mini (A&A Biotechnology, Gdynia, Polen) verwendet. Die Schritte wurden nach dem vom Hersteller beiliegenden Protokoll für Körperflüssigkeiten durchgeführt.

Da jedoch nur eine minimale Menge an Probenflüssigkeit zur Verfügung stand, wurde auf die angegebene Pelletbildung verzichtet und im ersten Schritt 2,5 µl Probe mit 100 µl Tris Buffer gemischt. Außerdem wurden 200 µl Total Lysis buffer und 20 µl Proteinase K zugegeben. Nach 20 s Vortexen fand eine 20-minütige Inkubation bei 37°C statt. Anschließend wurde das Gemisch 5 min auf 70°C erhitzt und erneut 20 s gevortext.

Die so vorbereiteten Proben wurden danach für 2 min bei 12.000 rpm in die Zentrifuge gegeben. Der erhaltene Überstand wurde daraufhin über einen beiliegenden Filteraufsatz in ein 2 ml-Eppendorf-Tube pipettiert und samt Filter erneut für 1 min zentrifugiert. Im Filter verbliebene Flüssigkeitsreste wurden durch Zugabe von 500 µl Wash Solution A1 und nochmaliges Zentrifugieren über 1 min herausgelöst. Nach Umsetzen des Filters auf ein frisches 2 ml-Eppendorf-Tube wurde dieser Vorgang mit 400 µl Wash Solution A1 und 2-minütigem Zentrifugieren wiederholt. Um die sich nun im Filter befindliche DNA herauszulösen, wurde dieser nochmals auf ein frisches, steriles 1,5 ml-Eppendorf-Tube gesetzt und 100 µl Tris Buffer hinzugefügt. Der Puffer war zuvor auf 75°C erhitzt worden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min und abschließendem Zentrifugieren über 1 min wurde der Filter entfernt und das erhaltene DNA-Extrakt sofort bei -20°C gelagert.

Real-time PCR

Die PCR wurde mit Hilfe des Thermocyclers Rotor-Gene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australien) durchgeführt, welcher auf dem Real-time PCR-Verfahren basiert.

Die Primer für die DNA der jeweiligen Bakterien lagen im Laborbereich Orale Mikrobiologie am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena vor. Sie wurden nach den von Ashimoto et al. (1996) für P.g., P.i., T.f. und T.d., bzw. Tran und Rudney (1999) für A.a. beschriebenen Sequenzen im Laborbereich Virologie hergestellt. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Primerpaare für die jeweiligen Bakterien.

Tab. 2: Primer für die DNA-Amplifikation

Bakterium	Primerpaar (forward und reverse Primer, je 5`nach 3`)
<i>P. gingivalis</i>	Pg-1: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG Pg-2: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT
<i>A. actinomycetem-comitans</i>	Aa-1: ATT GGG GTT TAG CCC TGG TG Aa-2: ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC
<i>P. intermedia</i>	Pi-1: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG Pi-2: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T
<i>T. forsythia</i>	Tf-1: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA Tf-2: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T
<i>T. denticola</i>	Td-1: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Td-2: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA

Als Ansatz für die Real-time PCR wurden pro Probe und Keim 2 µl DNA-Extrakt und 18 µl Mastermix (Gesamtvolumen 20 µl) in ein Eppendorf-Tube pipettiert. Der Mastermix setzte sich aus folgenden Reagenzien (bis auf Primer und A. dest. von der Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland stammend) zusammen:

- 2,0 µl 10 x Taq Puffer
mit 10⁻⁴ Sybr® Green I
- 2,2 µl 25 mM MgCl₂
- 1,0 µl 1 U/µl taq DNA Polymerase
- 2,0 µl 2 mM dNTP Mix
- 1,0 µl 0,5 µM Primer 1 (forward)
- 1,0 µl 0,5 µM Primer 2 (reverse)
- 8,8 µl A. dest. (Ampuwa®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)

Als positive Kontrollen wurden DNA-Extrakte von Referenz-Stämmen in einer Verdünnungskurve von 10⁷ bis 10³ Keimen genutzt. Aqua dest. diente als

Negativkontrolle. Jeweils 2 µl der Kontrollen wurden dazu den Proben identisch vorbereitet und jedem Lauf zugegeben.

Da das Probenkarussell des Gerätes über 36 Kammern verfügt, konnten mit jedem Lauf neben den vier Kontrollen maximal 32 Patientenproben gemessen werden.

Die Programmierung der PCR-Läufe beinhaltete mehrere Schritte. Die initiale Denaturierung der ursprünglichen DNA-Doppelstränge und Primer wurde bei einer Temperatur von 95°C über 5 min erreicht. Es folgten 45 Zyklen, jeweils beginnend mit der Denaturierung bei 95°C für 15 s, der anschließenden Anlagerung der Primer bei der keimspezifischen Annealing-Temperatur für 20 s und der DNA-Elongation bei 72°C über 20 s. Dabei betrug die Annealing-Temperatur für A.a. 58°C, für die restlichen Keime 60°C. Die nach den Zyklen folgende Dimerisierung der DNA-Amplifikate erfolgte bei 40°C binnen 2 min. Abschließend wurde erneut schrittweise bis auf 99°C erhitzt, um die Schmelzkurven zu erstellen.

Zur quantitativen Bestimmung der ursprünglich in den Proben befindlichen DNA und damit der Keimzahlen, wurden logarithmische Standardkurven bekannter Bakterienstandards verwendet. Auch die mitgeführte Verdünnungsreihe wurde hierfür genutzt. Die Schmelzkurvenanalyse gab darüber hinaus Informationen zur Spezifität der DNA-Amplifikate.

4.6 Bestimmung der Gingipain K-Konzentration

Die Konzentration an Kgp in den einzelnen Proben wurde mit einem oberflächengebundenen, heterogenen und nicht-kompetitiven Enzymimmunttest im Sandwich-Verfahren (ELISA) bestimmt.

4.6.1 Prinzip

Bei diesem Verfahren werden die Wände der Vertiefungen von Mikrotiter-Platten aus Polystyrol mit einem Antikörper (1. oder Coating-Ak) beschichtet, welcher das gesuchte Antigen (hier Kgp) bindet. Danach wird die zu untersuchende Lösung (hier GCF) hinzugegeben. Die Kgp-Moleküle aus der GCF binden sich an den 1. Ak und bleiben so trotz Auswaschen der Probenlösung fixiert. In dem hier angewendeten Prinzip wurde ein 2. Ak

gegen Kgp eingesetzt, der sich nun an das fixierte Kgp bindet. Nach erneutem Spülen wird ein 3., mit alkalischer Peroxidase gekoppelter Ak (Konjugat) zugegeben, welcher an den 2. Ak bindet. Die Vertiefung wird letztmalig ausgewaschen und danach ein Substrat zugegeben. Peroxidase und Substrat reagieren in diesem Fall unter Bildung eines blauen Produktes. Nach der Inkubationszeit wird diese Reaktion mit Säure gestoppt und es entsteht eine Gelbfärbung. Deren Intensität, gemessen als Absorption mit einem Photometer bei $\lambda = 450 \text{ nm}$, kann anhand einer Standardkurve auf die vorliegende Konzentration von Kgp umgerechnet werden.

4.6.2 Vorversuche

Die Konzentration an Gingipainen in der GCF ist verhältnismäßig niedrig, im Besonderen bei Kgp. Demzufolge galt es zunächst, die beste Kombination aus erstem und zweitem Ak gegen Kgp zu finden. Die Vorversuche wurden mit denselben Schritten, Pufferlösungen und Konzentrationen wie später bei den Proben durchgeführt (siehe Abschnitt 4.6.3).

Um die Effektivität der Antikörper zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe mit gereinigtem Kgp (zur Verfügung gestellt von Prof. Jan Potempa, Jagiellonen-Universität, Krakau) hergestellt, welche in den späteren Läufen mit der GCF (siehe Abschnitt 4.6.3) auch als Standard diente. Diese sah folgendermaßen aus (Abb. 5):

Konzentration Kgp

1000 ng/ml:	0,43 μl Kgp	+	999,57 μl 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 1
100 ng/ml:	100 μl L. 1	+	900,00 μl 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 2
10 ng/ml:	100 μl L. 2	+	900,00 μl 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 3
1 ng/ml:	100 μl L. 3	+	900,00 μl 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 4
0,1 ng/ml:	100 μl L. 4	+	900,00 μl 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 5
0,01 ng/ml:	100 μl L. 5	+	900,00 μl 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 6
0,001 ng/ml:	100 μl L. 6	+	900,00 μl 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 7
0 ng/ml:			1 ml 1%BSA/PBS-T	→	1 ml L. 8

Abb. 5: Herstellung der Lösungen (L.) für die Kgp-Verdünnungsreihe

In einem **ersten Vorversuch** sollten nun verschiedene Kombinationen aus mono- und polyklonalen Antikörpern (zur Verfügung gestellt von Prof. Jan Potempa, Jagiellonen-Universität, Krakau) getestet werden:

- a) monoklonaler Coating-Ak und polyklonaler 2. Ak
- b) polyklonaler Coating-Ak und monoklonaler 2. Ak

Zusätzlich wurden dabei Kombinationen aus Antikörpern verschiedener Herkunft getestet. Darunter waren fünf Ak aus dem Serum vom Huhn (chicken anti ~) sowie drei Ak aus Serum vom Hasen (rabbit anti ~), beide polyklonal. Der eingesetzte monoklonale Ak stammte von Mäuse-Serum (mouse anti ~). Daraus ergab sich eine Zahl von 16 Kombinationen, die nach dem in Abb. 6 gezeigten Schema auf drei Mikrotiter-Platten verteilt wurden. Aus den jeweils zwei aufgetragenen Verdünnungsreihen pro Ak-Kombination wurden danach die gemessenen Absorptionswerte der einzelnen Kgp-Konzentrationen zu einer Standardkurve umgerechnet. Es fand sich hierbei jedoch keine geeignete Kombination.

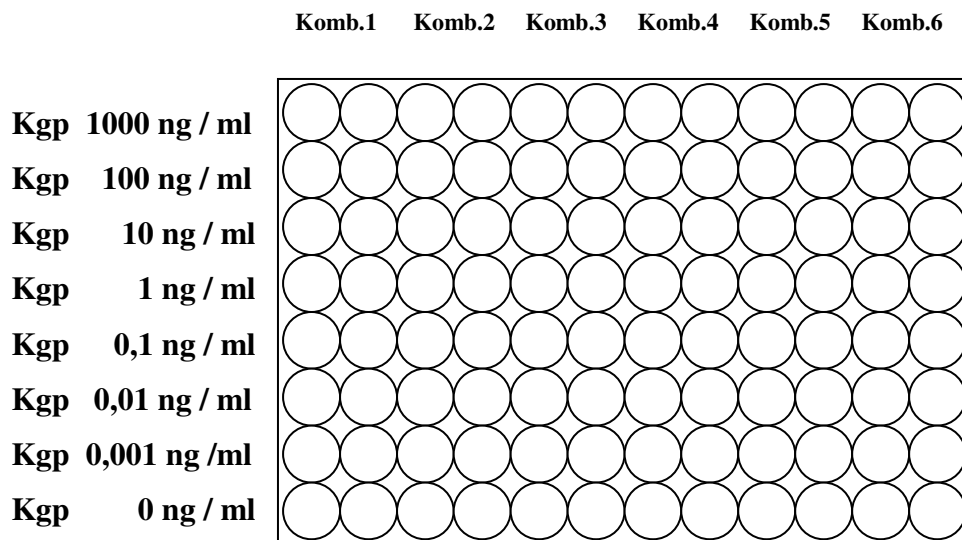


Abb. 6: Pipettierschema für die Ak-Kombinationen (Komb.) auf den Mikrotiter-Platten

In einem **zweiten Vorversuch** wurden daher statt einem immer zwei Coating-Ak kombiniert, um eine bessere Fixierung der in der GCF vorhandenen Kgp-Moleküle zu erhalten. Der zusätzliche Antikörper war ein polyklonaler Ak gegen Gingipaine. Es wurden dabei die fünf besten Kombinationen aus dem ersten Vorversuch mit dem zusätzlichen Coating-Ak ergänzt und nach dem gleichen Pipettierschema wie unter Abb. 6 getestet. Bei der Auswertung der anschließend erstellten Standardkurven konnte die

gesuchte Ak-Kombination gefunden werden (Abb. 7). Diese setzte sich aus folgenden Antikörpern zusammen:

Coating-Ak: Chicken anti 95 kDa RGP-1, polyklonal

mAb anti Kgp II, clon 19G8.G5.E6.C2, monoklonal

2. Ak: Rabbit anti KGP, polyklonal

3. Ak: anti rabbit HRP (BM 1814141)

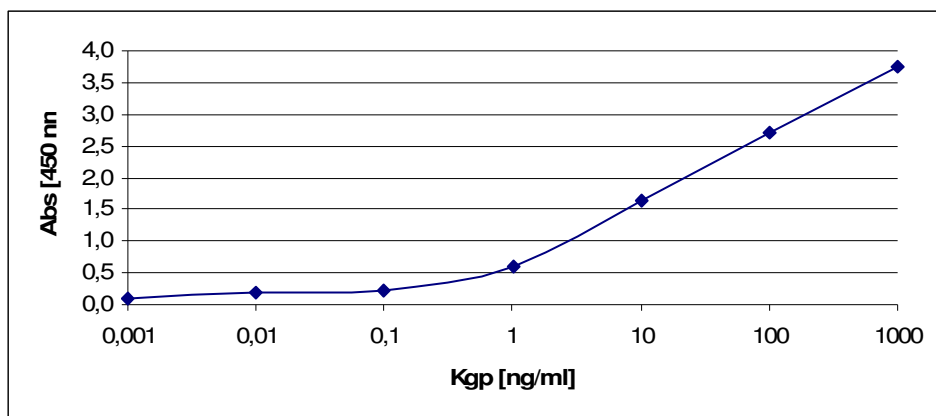


Abb. 7: Standardkurve der ausgewählten Ak-Kombination, x-Achse: Absorption (Abs), y-Achse: Kgp-Konzentration

4.6.3 Durchführung

Die Rezepturen der Puffer können im Anhang nachgelesen werden.

Beschichtung der Mikrotiter-Platten mit Coating-Ak

Zunächst wurden die beiden Coating-Ak, Chicken anti 95 kDa RGP-1 (polyklonal) und mAb anti Kgp II, clon 19G8.G5.E6.C2 (monoklonal), auf eine Konzentration von 1 µg/ml in Coating-Puffer verdünnt. Pro Vertiefung wurden nun 100 µl der Lösung pipettiert und die Mikrotiter-Platten (Nunc-ImmunoTM Module mit MaxiSorpTM Oberfläche, Nunc, Dänemark) mit dem zugehörigen Deckel abgedeckt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Vertiefungen viermal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gespült.

Blocken unspezifischer Bindungsstellen

Hierfür wurden 200 µl Blocking Puffer in jede Vertiefung pipettiert und die Platten abgedeckt für 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss wurde ebenfalls viermal mit je 200 µl Waschpuffer gespült.

Herstellung der Kgp-Verdünnungsreihe und Vorbereitung der Proben

Die Kgp-Verdünnungsreihe wurde nach dem unter Abschnitt 4.6.2 angegebenen Schema hergestellt (Abb. 5).

Bei den Patientenproben wurden jeweils 10 µl der GCF-Flüssigkeit mit 90 µl Probenpuffer vermischt. Die daraus erhaltenen 100 µl pro Probe wurden zusammen mit den Lösungen der Kgp-Verdünnungsreihe nach dem unter Abb. 8 dargestellten Schema auf die Mikrotiter-Platten verteilt. Während dabei die Verdünnungsreihe wie bei den Vorversuchen zweimal pro Platte aufgetragen wurde, folgten die GCF-Proben nur einmalig in fortlaufender Nummerierung.

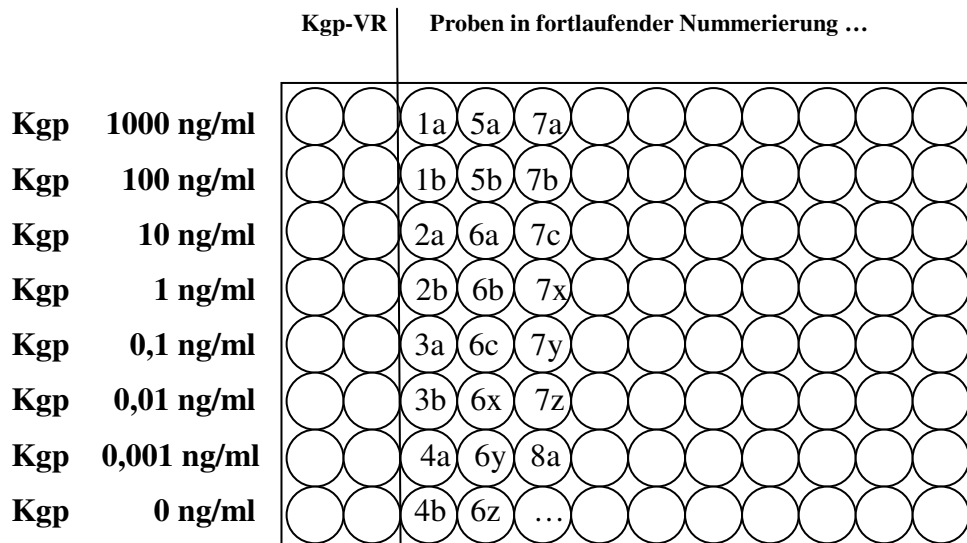


Abb. 8: Pipettierschema für die Kgp-Verdünnungsreihe (Kgp-VR) und die Proben auf den Mikrotiter-Platten

Anschließend erfolgte die Inkubation der abgedeckten Platten über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Vertiefungen fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer gespült und Pufferreste durch Abklopfen auf saugfähigen Papiertüchern entfernt.

Auftragen des 2. Antikörpers

Auch der 2. Ak, Rabbit anti KGP, wurde auf eine Konzentration von 1 µg/ml mit dem Probenpuffer verdünnt. Jeweils 100 µl der Lösung wurden danach in jede Vertiefung pipettiert und die Platten abgedeckt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde erneut fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer pro Vertiefung gespült und die Platten getrocknet.

Auftragen des Konjugates

Der 3. Ak., anti rabbit HRP, musste zunächst 1:10.000 in Probenpuffer verdünnt werden. Alle weiteren Schritte waren denen des zweiten Antikörpers identisch.

Zugabe des Substrates

Als Substrat kam das TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL, Inc., Gaithersburg, USA) zur Anwendung. Wie vom Hersteller angegeben, wurden die beiden Komponenten vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend zu gleichen Teilen gemischt. In jede Vertiefung wurden 100 µl des Substrates pipettiert. Dabei wurde so vorgegangen, dass das Substrat mit einer 8-Kanal-Pipette (10-100 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) auf alle Vertiefungen einer vertikalen Reihe gleichzeitig pipettiert wurde. Zwischen den einzelnen Reihen wurde jeweils 10 s gewartet. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei Raumtemperatur. Während dieser Dauer wurden die Platten vor Licht geschützt.

Stoppen der Reaktion

Um die Reaktion zu beenden, wurden zu jeder Vertiefung 100 µl 1 % H₂SO₄ gegeben. Auch hierbei wurde reihenweise vorgegangen und die gleiche zeitliche Differenz wie bei der Zugabe des Substrates eingehalten. Somit konnte eine einheitliche Inkubationszeit garantiert werden.

AbleSEN der Platten

Die Messung der Farbintensität wurde bei 450 nm mit dem Spektrophotometer SpectraMax 250 (Molecular Devices, GMI, Inc., USA) sowie dem zugehörigen Softwareprogramm (SoftMax Pro, Version 4.7) durchgeführt. Die erhaltenen Absorptionswerte der Kgp-Verdünnungsreihe konnten im Anschluss gegen die bekannten Konzentrationen dieser Verdünnungsreihe aufgetragen und zu einer logarithmischen Standardkurve umgerechnet werden. Diese Standardkurve diente zur Berechnung der Kgp-Konzentrationen in den Patientenproben.

4.7 Statistische Auswertung

Die klinischen Daten der Probanden wurden mit dem T-Test nach Student ausgewertet. Als statistisch signifikant galten dabei Werte ab $p < 0,05$. Da bei allen anderen Werten keine Normalverteilung vorlag, wurden signifikante Unterschiede der bakteriellen Belastungen mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt, wobei das Signifikanzniveau auch hier bei $p < 0,05$ festgelegt wurde. Zur Bestimmung von Korrelationen unter den einzelnen Parametern diente der Spearman-Test. Die Verteilungseigenschaften der Grundgesamtheit wurden mit dem χ^2 -Test nach Pearson bestimmt.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Daten

Von den insgesamt 23 teilnehmenden Personen wurden jeweils neun den Patientengruppen mit CP oder AP zugeordnet, fünf bildeten die parodontal gesunde Kontrollgruppe. Die demographischen Daten zu den einzelnen Gruppen sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Demographische Daten der Probanden

	Kontrollgruppe	AP	CP
Anzahl	5	9	9
Alter [Jahre \pm SD]	26,2 \pm 1,1	34,8 \pm 6,5	59,1 \pm 8,1
Geschlecht [m:w]	2:3	5:4	4:5

Die klinische Untersuchung (Abb. 9) ergab für die Kontrollgruppe eine mittlere Sondierungstiefe von $1,28 \pm 0,29$ mm. Die Patienten mit AP hatten dagegen im Mittel $5,86 \pm 0,69$ mm PD, jene mit CP $5,45 \pm 0,84$ mm. Als Maß für den Entzündungsgrad wurde der Blutungsindex (BoP) ermittelt. Die Kontrollgruppe zeigte eine Blutung bei $6,43 \pm 7,45\%$ der sondierten Taschen. In den Patientengruppen lagen diese Werte bei $80,48 \pm 18,67\%$ für AP-Patienten und $82,66 \pm 17,34\%$ für CP-Patienten. Sowohl bei der Sondierungstiefe als auch beim Blutungsindex zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppen.

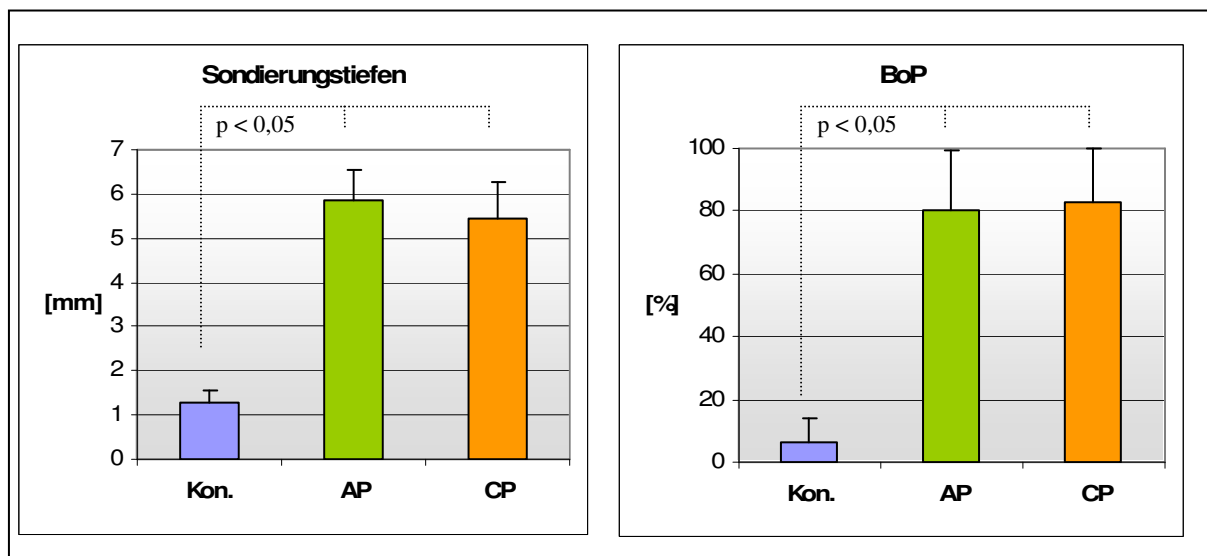


Abb. 9: Sondierungstiefen und Blutungsindices der Probandengruppen, Mittelwerte und SD

5.2 Nachweis parodontopathogener Bakterien

Im Folgenden sind die PCR-Ergebnisse der nachzuweisenden Keime (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola*) dargestellt. Das Vorkommen wurde dabei nach Probandengruppen und im Fall der Patienten zudem nach Sondierungstiefen differenziert betrachtet.

Kontrollgruppe

Nur zwei der fünf analysierten Bakterienspezies waren bei den gesunden Probanden nachweisbar. So wurde *A. actinomycetemcomitans* bei vier von fünf Personen und in 50% der Proben nachgewiesen. Drei Personen und 40% der Proben waren ebenso positiv auf *T. forsythia* getestet worden. Träger von *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *T. denticola* waren nicht vertreten. Die positiven Proben enthielten dabei jedoch ausschließlich Keimzahlen von weniger als 10^3 Keimen pro Probe (Abb. 10).

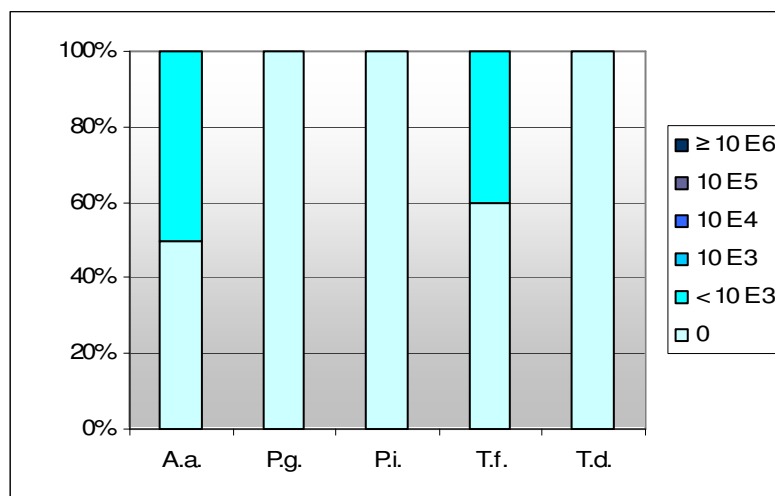


Abb. 10: Nachweis parodontopathogener Spezies in der Kontrollgruppe

Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis

A. actinomycetemcomitans konnte bei fünf Patienten mit AP nachgewiesen werden, in der Gruppe mit CP waren es sechs Personen. Die Anzahl der Proben mit klinisch relevanten Keimzahlen lag in der Gruppe der AP-Patienten für Sondierungstiefen von maximal 3,5 mm bei 28%, für mittlere und tiefe Stellen bei 33%. Wurden in Taschen mit 4-5,5 mm ST

generell nur niedrige Bakteriendichten nachgewiesen, so konnten bei flachen und tiefen Stellen auch sehr hohe Keimzahlen ($\geq 10^6$ Keime pro Probe) festgestellt werden. In der Gruppe mit CP zeigte sich für mittlere Sondierungstiefen ein identisches Ergebnis. Flache und tiefe Taschen wiesen dagegen weniger positive Stellen und diese mit geringeren Bakteriendichten auf als in der AP-Gruppe. So lag der Höchstwert in flachen Taschen bei 10^3 Keimen je Probe, in tiefen Taschen bei 10^4 Keimen je Probe. Insgesamt hatte der Keim somit eine leichte Tendenz zur Gruppe mit AP. Die Sondierungstiefe zeigte nur bei CP-Patienten einen geringen Bezug zur Keimbelastung der Proben. (Abb. 11)

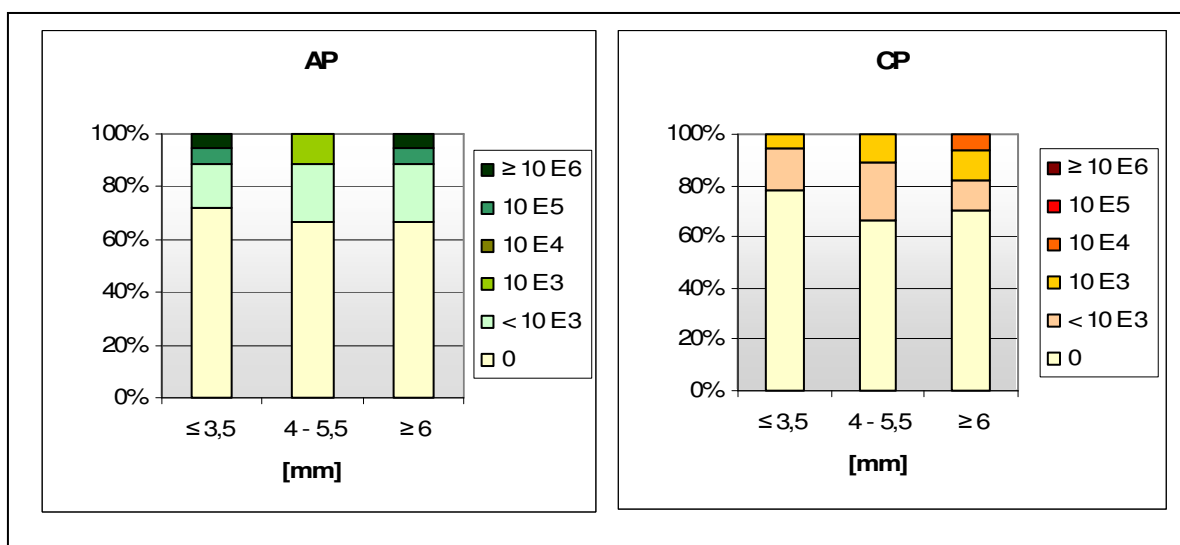


Abb. 11: Häufigkeiten der Keimzahlen von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

P. gingivalis konnte lediglich bei einer Person mit AP nicht nachgewiesen werden. Sowohl die Häufigkeit positiver Proben als auch deren jeweilige Keimzahlen nahmen in beiden Patientengruppen mit steigender Sondierungstiefe zu. Während bei beiden Diagnosen noch 61% der Stellen $\leq 3,5$ mm ST kein Vorkommen von *P. gingivalis* aufwiesen, waren es bei tiefen Taschen nur noch 17% im Fall der AP-Gruppe und 6% in der CP-Gruppe. Bezüglich der Keimzahlen zeigten flache Taschen maximal 10^3 Keime pro Probe bei AP-Patienten, bei jenen mit CP höchstens 10^4 Keime pro Probe. Mittlere und tiefe Stellen wiesen zwar in beiden Gruppen auch höchste Bakteriendichten ($\geq 10^6$ Keime pro Probe) auf, die Gesamtbelastung war bei Patienten mit CP aber höher. So zeigten diese Patienten in 62 % der mittleren und 82% der tiefen Taschen $\geq 10^4$ Keime je Probe. In der Gruppe mit AP waren es dagegen nur 39% bei mittleren und 50% bei tiefen Stellen. (Abb. 12)

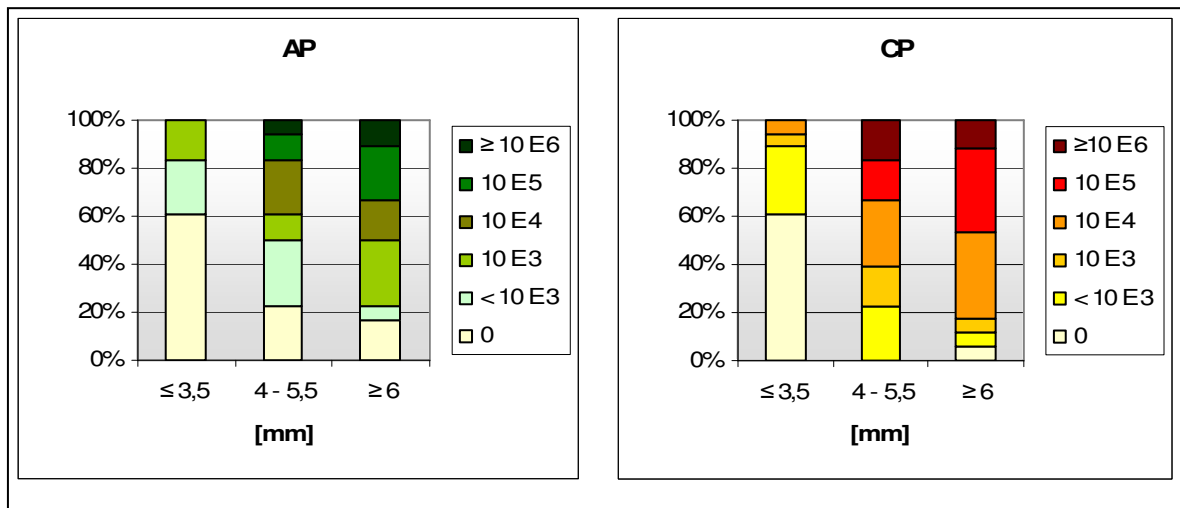


Abb. 12: Häufigkeiten der Keimzahlen von *Porphyromonas gingivalis*

P. intermedia wurde in der Gruppe mit AP nur bei zwei Patienten, in jener mit CP bei drei Patienten gefunden. Somit war *P. intermedia* der am seltensten nachgewiesene Erreger dieser Untersuchung. Ein Zusammenhang von Sondierungstiefe und Keimbelastung war nur für Proben der AP-Patienten erkennbar. Hier stieg die Zahl positiver Proben von 6% bei maximal 3,5 mm ST auf 22% bei tiefen Taschen. Auch bei Patienten mit CP stieg die Zahl positiver Proben im Vergleich von flachen und tiefen Stellen um 11%. Während jedoch die maximal erreichten Keimzahlen in der AP-Gruppe mit zunehmender Sondierungstiefe von 10^3 auf $\geq 10^6$ Keime je Probe anstiegen, blieb es in der CP-Gruppe bei einer maximalen Bakteriendichte von 10^4 Keimen pro Probe. (Abb. 13)

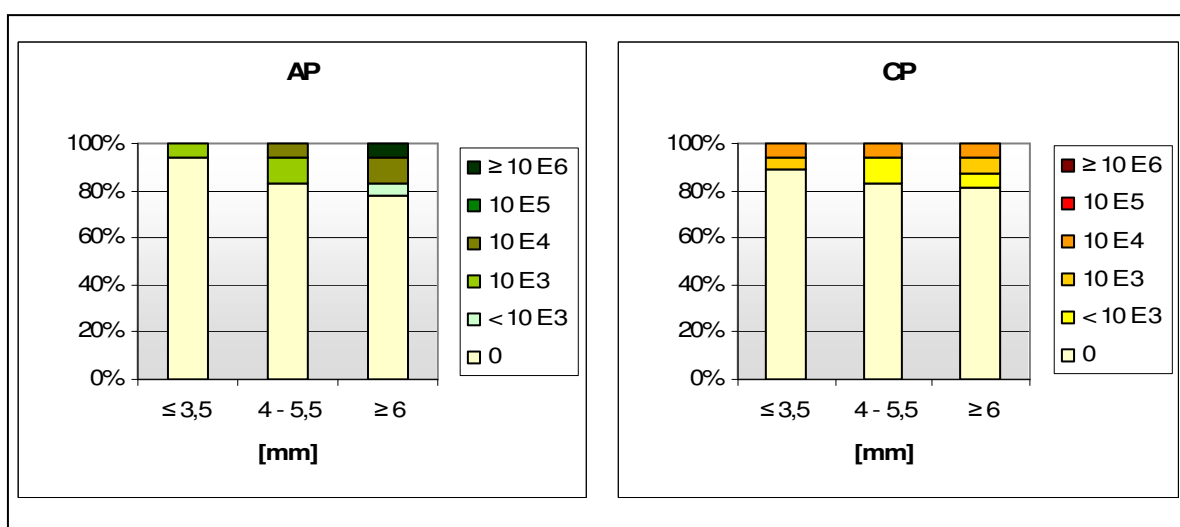


Abb. 13: Häufigkeiten der Keimzahlen von *Prevotella intermedia*

T. forsythia konnte bei allen untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Die differenziertere Betrachtung spiegelt eine Tendenz zu vermehrtem Auftreten von *T. forsythia* bei den Patienten mit AP ebenso wieder wie eine Proportionalität von Keimzahlen und Sondierungstiefe. Zwar kamen negative Proben im Falle der AP-Patienten bei allen Sondierungstiefen mit je 22% gleich häufig vor, die gemessenen Keimzahlen jedoch stiegen an. So enthielt die Mehrzahl der Stellen von maximal 3,5 mm ST nur geringe Keimzahlen, während tiefe Taschen bereits zu 17% sehr hohe Bakteriendichten ($\geq 10^6$ Keime pro Probe) aufwiesen. Deutlicher war diese Abhängigkeit in der Gruppe mit CP ausgeprägt. Hier stieg die Zahl positiver Proben von 33% der Stellen mit maximal 3,5 mm ST auf knapp 76% der tiefen Stellen. Auch die durchschnittliche Bakteriendichte stieg mit zunehmender Sondierungstiefe an. Erreicht wurde jedoch nur ein Maximum von 10^5 Keimen pro Probe. (Abb. 14)

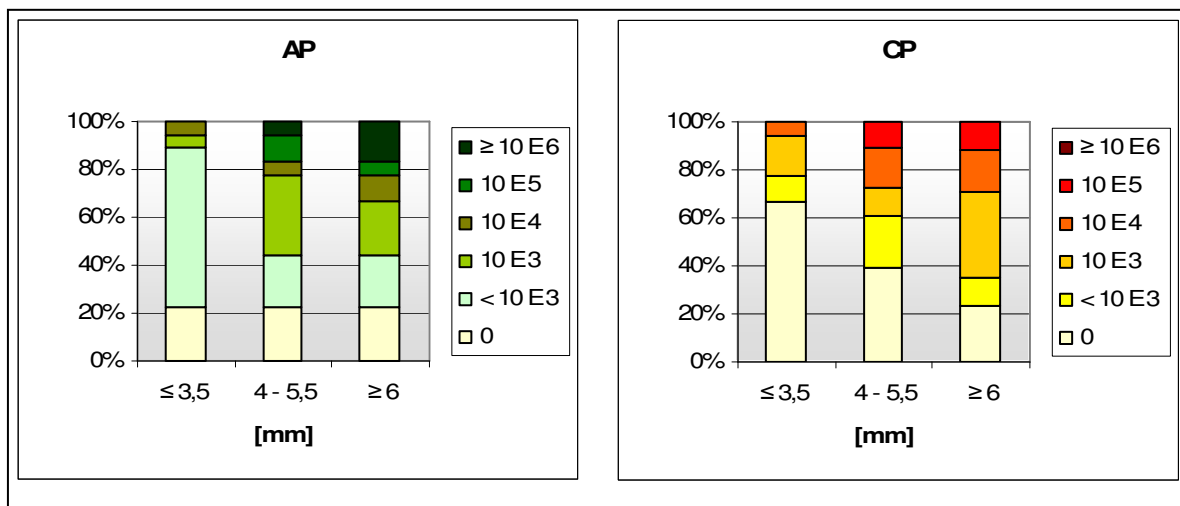


Abb. 14: Häufigkeiten der Keimzahlen von *Tannerella forsythia*

T. denticola war bei allen Patienten mit AP nachweisbar, nicht jedoch bei drei Personen mit CP. In beiden Gruppen zeigte sich eine steigende Präsenz des Keimes mit zunehmender Sondierungstiefe. So stieg bei Patienten mit AP die Zahl positiver Proben von 11% der Stellen $\leq 3,5$ mm ST auf 78% der tiefen Taschen. Ebenso deutlich stiegen die gemessenen Keimzahlen. Maximal 10^3 Keime pro Probe waren es in Stellen $\leq 3,5$ mm ST, in mittleren höchstens 10^4 . Tiefe Taschen wiesen sogar zu 11% höchste Bakteriendichten auf. Etwas weniger deutlich war diese Korrelation bei Patienten mit CP. Hier lag die Zahl positiver Proben für alle Sondierungstiefen bei gut 50%. Die durchschnittliche Bakteriendichte jedoch stieg auch in dieser Gruppe mit zunehmender Taschentiefe an. So lag das Maximum in flachen Stellen bei weniger als 10^3 Keimen pro Probe. Werte ab 10^5

Keimen je Probe konnten in mittleren Taschen bereits bei 11% der Proben, in tiefen Taschen sogar bei knapp 24% gefunden werden. Insgesamt war keine Tendenz zu einer der beiden Gruppen klar ersichtlich. (Abb. 15)

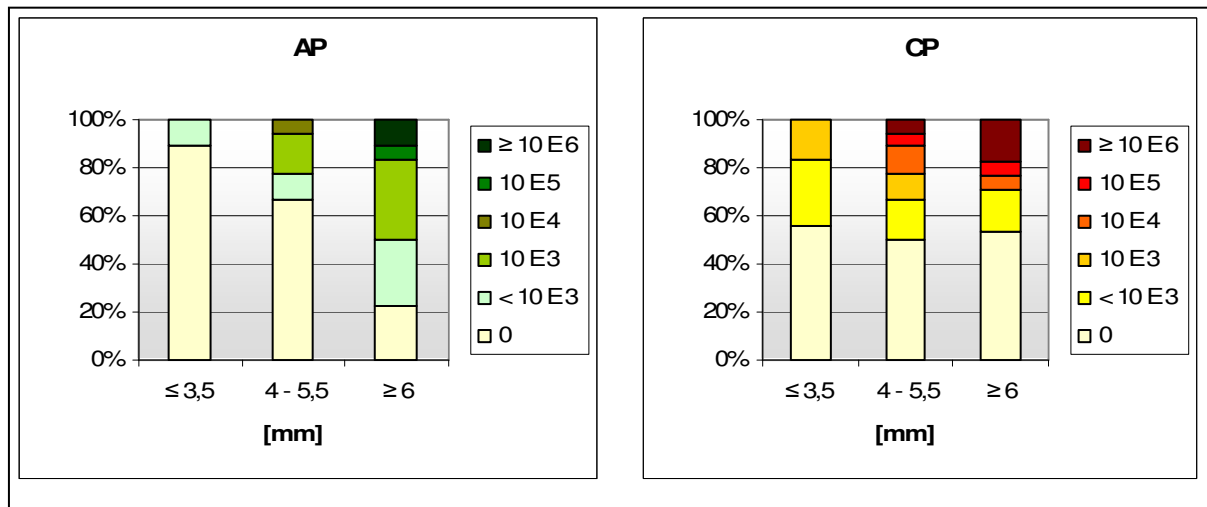


Abb. 15: Häufigkeiten der Keimzahlen von *Treponema denticola*

5.3 Bestimmung des Gingipain K-Spiegels

Mit der ermittelten Antikörperkombination konnte Gingipain K in den Proben ab einer Nachweisgrenze von 0,01 ng/ml Probenansatz detektiert werden. Werte darunter mussten als unspezifisch und daher negativ bewertet werden. Unter den 118 getesteten Stellen fanden sich jedoch nur 13 Sulkusflüssigkeiten, welche die Protease in der entsprechenden Konzentration enthielten.

Folgend sind die Unterschiede zwischen den Probandengruppen und Sondierungstiefen dargestellt.

Kontrollgruppe

Bei keiner der 10 Proben aus gesunden Sulci konnte Gingipain K nachgewiesen werden.

Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis

Bezüglich der Häufigkeit des Kgp-Nachweises zeigte sich eine leichte Tendenz zu Sites der Patienten mit AP. Die Differenzen betrugen dabei aber nur 11% bezogen auf die Person und 9% bei den Proben (Tab. 4).

Tab. 4: Kgp-Nachweis bezüglich Patienten und Proben, [n]

	AP		CP	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Personen	4	5	3	6
Proben	9	45	4	50

Die differenziertere Betrachtung der Ergebnisse zeigte zunehmendes Vorkommen von Kgp mit steigender Sondierungstiefe (Tab. 5). So konnte in nicht pathologischen Sulci mit maximal 3,5 mm ST kein Kgp gefunden werden. Mittlere Sondierungstiefen wiesen in beiden Gruppen knapp 11% positive Stellen auf. Bei tiefen Taschen wies die CP-Gruppe ebenfalls nur 11% positive Stellen auf, bei den Patienten mit AP enthielten jedoch 39% der Proben Gingipain K in nachweisbarer Konzentration.

Tab. 5: Einfluss der Sondierungstiefe auf das Vorkommen Kgp-positiver Proben, [n]

ST [mm]	AP		CP	
	positiv	negativ	positiv	negativ
≤ 3,5	0	18	0	18
4-5,5	2	16	2	16
≥ 6	7	11	2	16

Die gemessenen Kgp-Konzentrationen lagen zwischen 0,07 ng/ml und 10,98 ng/ml. Ein deutlicher Zusammenhang einzelner Werte mit der jeweiligen Sondierungstiefe war hierbei nicht feststellbar. Bezüglich der Patientengruppen konnten Mittelwerte von $3,8 \pm 3,7$ ng/ml bei Patienten mit AP und $4,5 \pm 5,3$ ng/ml bei Patienten mit CP ermittelt werden, was aufgrund der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Proben jedoch nicht als typisch gelten kann.

5.4 Abbau von Immunglobulin G1 und G2

Eine Spaltung des Immunglobulin G1 konnte insgesamt bei 44% der Probanden und 24% der Proben gefunden werden. Nachfolgend sind die Unterschiede bezüglich Probandengruppen und Sondierungstiefen dargestellt.

Kontrollgruppe

In keiner der 10 getesteten Proben gesunder Personen fanden sich Hinweise auf eine Spaltung von IgG1 und IgG2 in der vermuteten Region. Auf den Filmen zeigten sich lediglich Banden im Bereich von 50 kDa, was den ungespaltenen schweren Ketten der Moleküle entspricht. (Abb.16)

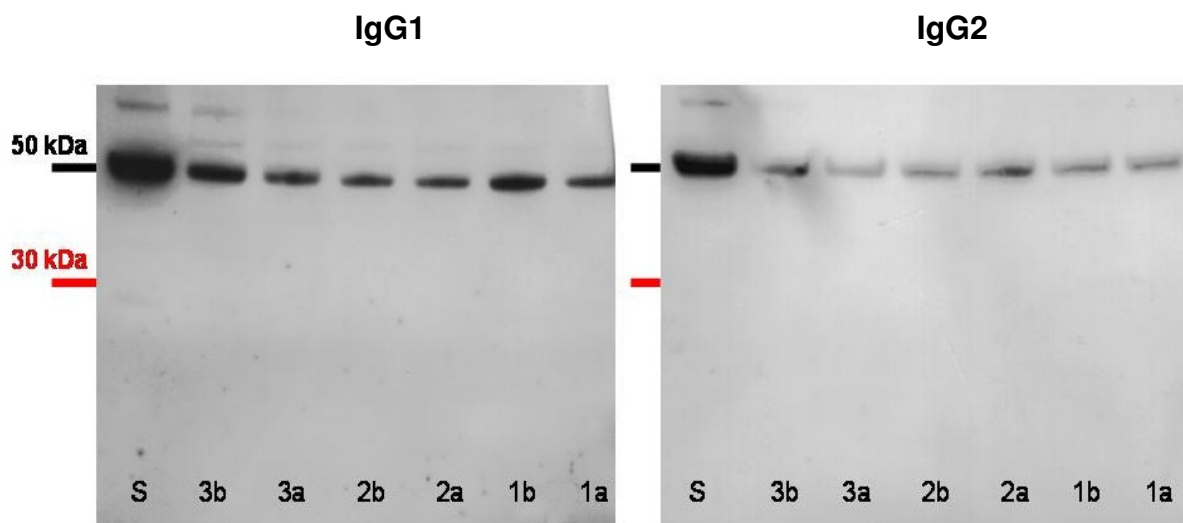


Abb. 16: Western Blot, Beispiel aus der Kontrollgruppe

1a-3b: Proben von 3 Personen, **S:** Standard-Immunglobulin G1 bzw. G2

50 kDa: Bereich der ungespaltenen schweren Ketten der Immunglobuline

30 kDa: Bereich der vermuteten Spaltstücke beim Abbau der schweren Ketten durch Kgp

Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis

Die gesuchte Spaltung der schweren Ketten des IgG1 konnte bei 10 Patienten und in 28 ihrer Proben gefunden werden. Differenziert nach Diagnosen wiesen 67% der Patienten mit AP und 44% jener mit CP die gesuchten Fragmente auf (Tab. 6). Bezüglich der Proben lagen diese Anteile jedoch nur bei 33% und 19%.

Eine entsprechende Spaltung der schweren Ketten des IgG2 war bei keiner der Proben nachweisbar.

Tab. 6: Abbau von Immunglobulin G1 bei Patienten mit AP und CP, [n]

	AP		CP	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Personen	6	3	4	5
Proben	18	36	10	44

Tabelle 7 stellt die nach Sondierungstiefen differenzierte Betrachtung des IgG1-Abbaus dar. Beide Patientengruppen wiesen bei knapp 6% der Stellen mit maximal 3,5 mm ST eine Spaltung der Moleküle auf. Mit zunehmender Taschentiefe stiegen diese Werte in beiden Gruppen an. Deutlicher ist diese Proportionalität jedoch bei Patienten mit CP. So zeigten bei mittleren Taschentiefen bereits 44% der Proben von AP-Patienten und etwa 17% derer von CP-Patienten einen entsprechenden Abbau. Für Sondierungstiefen ≥ 6 mm waren es 50% der Proben von AP-Patienten und 33% der Proben von CP-Patienten.

Tab. 7: Einfluss der Sondierungstiefe auf das Vorkommen der IgG1-Spaltung

ST [mm]	AP		CP	
	positiv	negativ	positiv	negativ
$\leq 3,5$	1	17	1	17
4-5,5	8	10	3	15
≥ 6	9	9	6	12

In den Abbildungen 17 und 18 ist jeweils ein Beispiel der Western Blot-Filme aufgeführt. Vergleichend dazu sind Tabelle 1 und Abbildung 1 in Kapitel 4 zu betrachten.

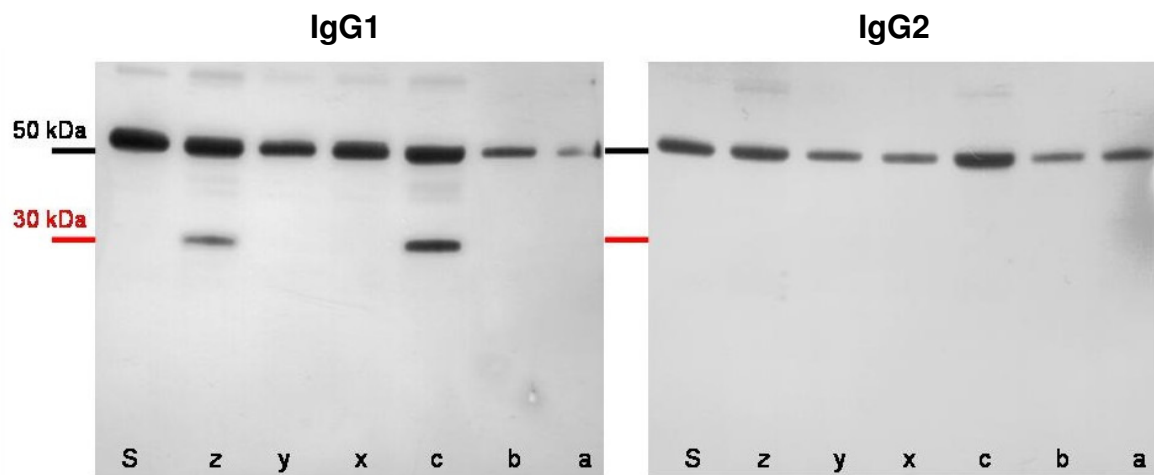


Abb. 17: Western Blot eines Patienten mit aggressiver Parodontitis, Proben c und z positiv bezüglich IgG1-Spaltung

a-z: Proben einer Personen,

davon je a und c: $\leq 3,5$ mm ST, b und y: 4-5,5 mm ST, c und z: ≥ 6 mm ST

S: Standard-Immunglobulin G1 bzw. G2

50 kDa: Bereich der ungespaltenen schweren Ketten der Immunglobuline

30 kDa: Bereich der vermuteten Spaltstücke beim Abbau der schweren Ketten durch Kgp

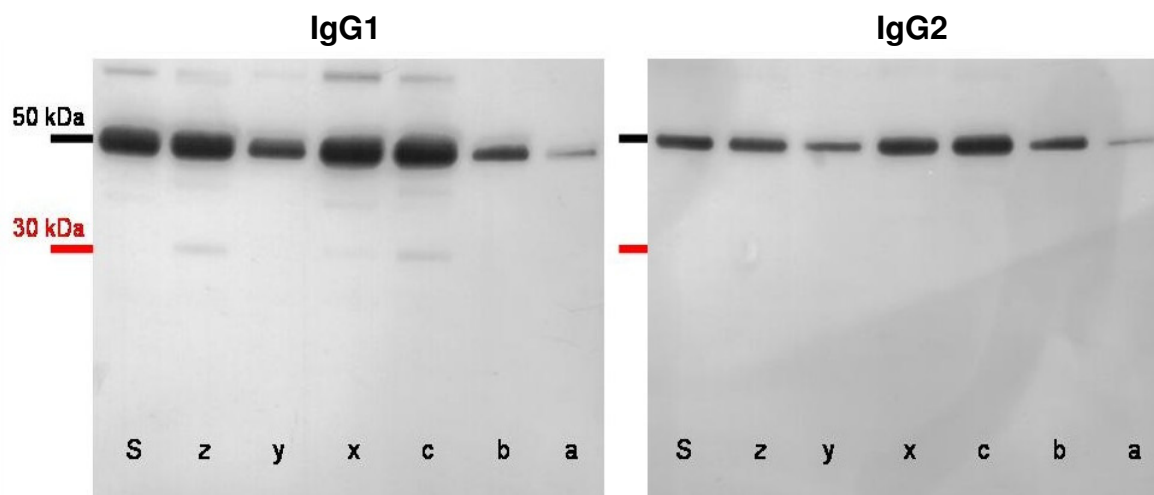


Abb. 18: Western Blot eines Patienten mit chronischer Parodontitis, Proben c, x und z positiv bezüglich IgG1-Spaltung

a-z: Proben einer Personen,

davon je a und c: $\leq 3,5$ mm ST, b und y: 4-5,5 mm ST, c und z: ≥ 6 mm ST

S: Standard-Immunglobulin G1 bzw. G2

50 kDa: Bereich der ungespaltenen schweren Ketten der Immunglobuline

30 kDa: Bereich der vermuteten Spaltstücke beim Abbau der schweren Ketten durch Kgp

Abgesehen von dem Bereich um 30 kDa fanden sich in einigen Proben zusätzliche Banden variierender Molekulargewichte (Abb. 19). Diese waren zum Teil als scharf abgrenzbare Banden, manchmal auch als verwischte Bereiche wiedergegeben. Derartige Proben stammten meist aus mittleren und tiefen Taschen. Sie zeichneten sich zudem fast immer durch sehr starke Banden im Bereich von 50 kDa aus.

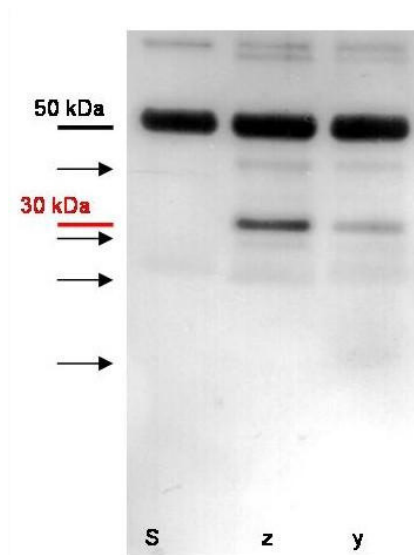


Abb. 19: Beispiel aus einem Western Blot mit Proben, welche zusätzliche Banden erkennen lassen

z, y: Proben einer Personen; davon z: ≥ 6 mm ST, y: 4-5,5 mm ST

S: Standard-Immunglobulin G1

50 kDa: Bereich der ungespaltenen schweren Ketten des IgG1

30 kDa: Bereich der vermuteten Spaltstücke beim Abbau der schweren Ketten durch Kgp

→ : zusätzliche Banden

5.5 Zusammenhang von Mikroflora, Kgp und IgG1-Abbau

Parodontopathogene Erreger und Spaltung von IgG1

Um einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen bestimmter Bakterien und der Spaltung der schweren Ketten von IgG1 zu untersuchen, wurden die Keimzahlen der fünf analysierten Erreger in Proben mit und ohne Spaltung des Moleküls verglichen (Abb. 20). Höchstsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) konnten dabei für *P. gingivalis* und *P. intermedia* festgestellt werden. Diese ergeben sich aus insgesamt deutlich höherer bakterieller Belastung der Proben mit der gesuchten IgG1-Spaltung. Als immer noch hochsignifikant ($p < 0,01$) erwies sich dieser Unterschied für *T. forsythia*. Die Keime *A. actinomycetemcomitans* und *T. denticola* hingegen zeigten keinen signifikanten Bezug zu Fragmenten von 30 kDa. Auch bei den anderen Keimen gab es jedoch Proben, bei welchen ein Nachweis des jeweiligen Bakteriums gelang, ohne gleichzeitig die Spaltung der schweren Kette von IgG1 zu finden.

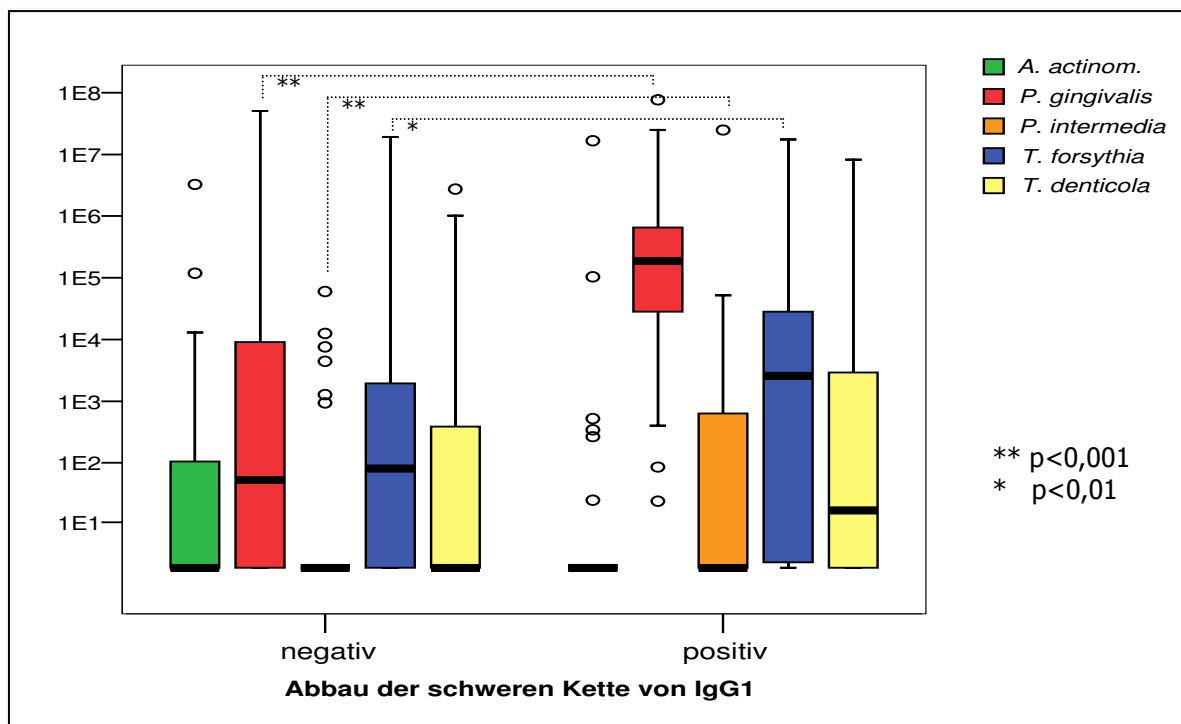


Abb. 20: Unterschiede der Keimzahlen bei Proben ohne und mit Spaltung von IgG1

Ein Auftreten zusätzlicher Banden von IgG1 war in allen Proben, welche eine Infektion mit *P. intermedia* aufwiesen, zu finden. Bei den anderen analysierten Erregern konnten diese Banden nur unregelmäßig beobachtet werden.

***P. gingivalis* und Gingipain K-Spiegel**

P. gingivalis konnte in 77 Proben der Parodontitispatienten gefunden werden. Nur bei 13 dieser Proben gelang zudem der quantitative Nachweis von Kgp. Obwohl damit viele GCF-Proben mit positivem Keimnachweis dessen Protease nicht in Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze enthielten, zeigte sich die Korrelation der gemessenen Kgp-Spiegel und der Keimzahlen des *P. gingivalis* (Abb. 21) als höchstsignifikant ($r = 0.091$; $p < 0,001$).

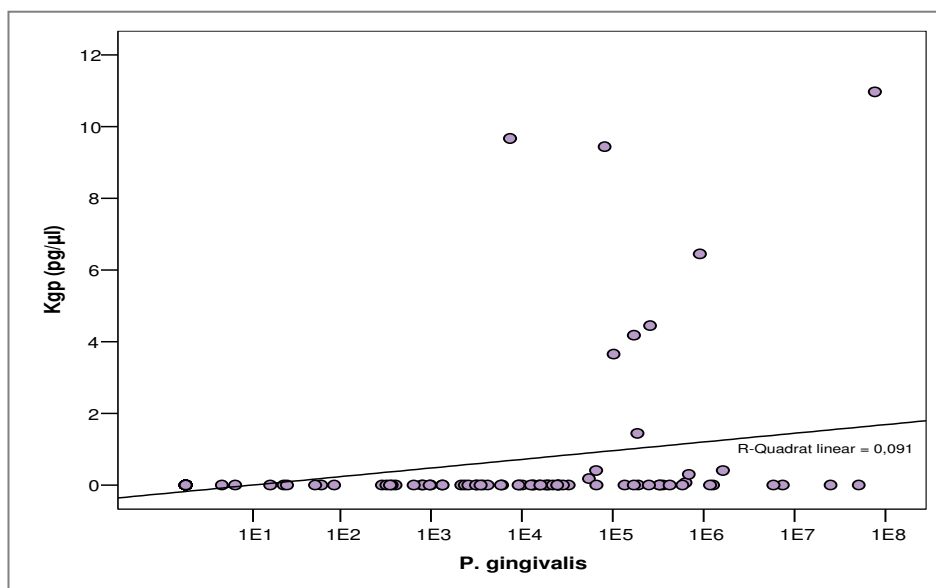


Abb. 21: Korrelation der Kgp-Konzentrationen und Keimzahlen von *P. gingivalis*, $p < 0,001$

Gingipain K und Abbau von IgG1

Um den Zusammenhang des Vorkommens von Kgp und einer Spaltung der schweren Kette von IgG1 zu untersuchen, wurden die gemessenen Konzentrationen der Protease in Proben ohne und mit Abbau von IgG1 verglichen (Abb. 22). Generell konnte Kgp dabei nur in Proben mit Spaltung des Immunglobulins gefunden werden, nie jedoch in solchen ohne dessen Abbau. Der Unterschied der Kgp-Spiegel zwischen beiden Proben-Gruppen erwies sich damit als höchstsignifikant ($p < 0,001$).

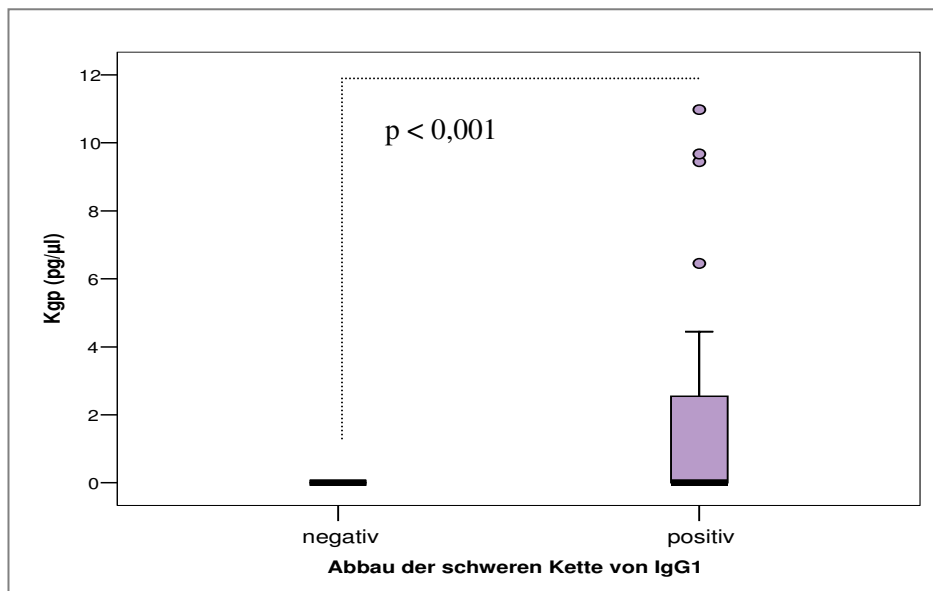


Abb. 22: Vergleich der Konzentrationen von Kgp in Proben ohne und mit IgG1-Spaltung

6 Diskussion

Anstoß für die vorliegende Studie waren die Ergebnisse einer In-vitro-Untersuchung zum Abbau von Immunglobulin G durch bakterielle Proteasen (Vincent et al. unveröffentlicht). Diese zeigte, dass IgG1 ein natürliches Substrat der Protease Kgp, einem Virulenzfaktor des parodontopathogenen Erregers *P. gingivalis*, ist.

Aus dieser Erkenntnis stellte sich die Frage, ob ein solcher Abbau des Antikörpers in-vivo von Bedeutung ist und mit der Protease in Verbindung steht. Da die Parodontitis jedoch eine typische Mischinfektion darstellt, sollte zudem der mögliche Einfluss weiterer bekannter parodontopathogener Bakterien untersucht werden. Die bisher verfügbare Literatur umfasst hierzu meist In-vitro-Studien. Auch der quantitative Nachweis von Kgp aus dem Gingivafluid wurde noch nie mittels hochspezifischer ELISA durchgeführt und stellte damit ein weiteres Ziel dar.

6.1 Material und Methoden

Zur **Gewinnung des klinischen Probenmaterials** wurde Sulkusflüssigkeit von jeweils neun Patienten mit CP und AP entnommen. Diese Krankheitsbilder nehmen den größten Teil von Parodontalerkrankungen ein. Als Kontrollgruppe dienten fünf Zahnmedizinstudenten, welche sich durch sehr gute Mundhygiene und parodontale Gesundheit auszeichnen. Die Diagnosen wurden nach den Kriterien des „International Workshop for a Classification System of Periodontal Diseases and Conditions“ aus dem Jahr 1999 (Armitage 1999, Lindhe et al. 1999, Lang et al. 1999) durch zwei in diesem Fachgebiet versierte Zahnärzte der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde, Abteilung Parodontologie, gestellt. Sie stützten sich neben der Anamnese auf die Befunde nach dem PSI und einem kompletten Röntgenstatus. Zur Feststellung des aktuellen Entzündungsgrades und des genauen Ausmaßes der parodontalen Taschen eignen sich die Erhebung des Blutungsindex (BoP) und Messung der Sondierungstiefe (PD) (Hugoson und Norderyd 2008), was bei allen Probanden an sechs Stellen je Zahn durchgeführt wurde.

Für die Entnahme der GCF wurde die intracreviculäre Waschmethode in Anlehnung an Sigusch et al. (1992) und Guentsch et al. (2006) gewählt. Durch das vorsichtige Einführen der Pipettenspitze in den Sulkus um etwa 1 mm und den anschließenden Spülvorgang

erfährt das parodontale Gewebe nur wenig Traumatisierung (Gustafsson 1996). Da hiermit der tatsächliche Anteil der GCF am Probenvolumen nicht bekannt ist, können quantitative Aussagen über nachzuweisende Substanzen allerdings nur auf die Probe und nicht auf das reine CGF-Volumen bezogen werden (Griffith 2003). Die ursprünglich für die Volumenmessung entwickelten GCF-Filterpapiere haben jedoch den Nachteil, dass einige Proteine, im Besonderen solche in niedriger Konzentration, nur mangelhaft wieder herausgelöst werden und somit schlechter nachweisbar sind (Johnson et al. 1999). Kgp und Immunglobuline sind Proteinstrukturen. In eigenen Vorversuchen zum Nachweis der Antikörper mittels Western Blot zeigten Proben, welche mit endodontischer Papierspitze (ISO 30) gewonnen waren, wesentlich schwächere Banden, als jene der Waschtechnik. In einer Studie zum Vergleich verschiedener Entnahmemöglichkeiten für GCF konnte auch die Protease Rgp aus verschiedenen Papierspitzen nur zu 23 - 26% wieder herausgelöst werden (Kramesberger 2009).

Für die **Untersuchung des bakteriellen Hintergrundes** eines Immunglobulin-Abbaus bei Parodontitis wurden die Erreger *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *P. intermedia* ausgewählt. Sie alle werden in starkem bis sehr starkem Zusammenhang mit parodontaler Erkrankung gesehen (Haffajee und Sokransky 1994).

Für den Erregernachweis kam die quantitative Real-time PCR zum Einsatz, welche sich als weit verbreitete Methode etabliert hat (Lyons et al. 2000, Sakamoto et al. 2001, Maeda et al. 2003, Boutaga et al. 2006). Im Gegensatz zum Kulturverfahren muss dabei nicht auf die Aufrechterhaltung spezieller Milieubedingungen anaerober Bakterien geachtet werden, da auch avitale Keime nachgewiesen werden. Sie zeichnet sich durch eine extrem niedrige Detektionsschwelle mit hoher Sensitivität und Spezifität aus (Tran und Rudney 1999, Lau et al. 2004, Boutaga et al. 2006). Die dabei verwendeten Primer wurden nach Ashimoto et al. (1996) für *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *P. intermedia* sowie nach Tran und Rudney (1999) für *A. actinomycetemcomitans* gewählt. Beide Studien geben für die Primer eine gute Spezifität und Sensitivität an. Tests zu den verwendeten Primern, Annealingtemperaturen und der Mastermix-Zusammensetzung erfolgten auch im eigenen Institut an Patientenproben (Voigt 2007, Wegner 2007) und bekräftigten durch ihre guten Ergebnisse die Auswahl. Eine Fehlerquelle des angewendeten Verfahrens stellt der DNA-Fluoreszenzfarbstoff Sybr[®] Green I dar, welcher auch unspezifische DNA bindet. Die durchgeführte Schmelzkurvenanalyse, logarithmische Standardkurven und stets

mitgeführte Verdünnungsreihen bekannter DNA-Mengen können dieses Risiko jedoch ausreichend eindämmen (Maeda et al. 2003, Morillo et al. 2003).

Zum **Nachweis eines Abbaus der Immunglobuline** eignet sich am besten die Kombination aus SDS-PAGE und Western Blot. Der Einsatz von Antikörpern gegen humanes IgG1 und IgG2 erlaubt eine hoch spezifische Detektion. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht kann zudem die gesuchte Spaltung aufdecken, was mit einer anderen gebräuchlichen Methode, dem ELISA, nicht möglich wäre.

Für die SDS-PAGE benötigen die Proteine eine hohe negative Ladung und eine möglichst geringe Masse, um die nötige gerichtete Beweglichkeit im elektrischen Spannungsfeld zu erreichen. Dazu wurden die Proben in Probenpuffern, welche mit dem anionischen Detergens SDS und einem SH-Reagens, hier DTT, versetzt waren, auf 99°C erhitzt. Dies entspricht einer üblichen Vorbereitung zu trennender Proteine bei der SDS-PAGE (Lee und Dunbar 1994). Neben einer Entfaltung und Spaltung von SH-Brücken, was zur Zerlegung oligomerer Proteine in deren Untereinheiten führt, kann es dabei auch zur Spaltung von Peptidbindungen kommen (Kubo 1995, Kowit und Maloney 1992). Dies würde die Klärung der Frage nach einer enzymatischen Spaltung erschweren. Beide genannten Studien zeigen dabei deutliche Einflüsse der verwendeten Chemikalien, der Erhitzungsdauer und der Proteinstrukturen auf. Eine weitere Studie, welche γ -Globuline einschließt, kommt zu dem Ergebnis, dass das Kochen bis zu 10 min meist keinen negativen Einfluss auf die Primärstruktur der Proteine hat. Zudem mindert währenddessen das Weglassen der SH-Reagenzien die Wahrscheinlichkeit einer Spaltung (Deutsch 1976). Die verwendeten Proben wurden – in Anlehnung an Vincents (2006) - aus diesen Gründen zunächst für 5 min in einem SDS-haltigen Puffer ohne DTT bei 99°C erhitzt, was zur Ausfällung der Proteine führt. Das SH-Reagens war erst dem 2. Probenpuffer beigesetzt. Somit lagen die Immunglobuline entfaltet und in Form zweier leichter und zweier schwerer Ketten vor (Ryan et al. 2008), im Falle einer vorherigen enzymatischen Spaltung auch als deren Bruchstücke. Als Kontrolle bei jedem Western Blot diente dabei ein Standard-IgG, welches die gleiche Aufbereitung wie die Proben erhielt.

Das Risiko einer Ig-Spaltung durch Proteasen aus der GCF nach Probenentnahme wurde durch die Zugabe des Protease-Inhibitors FFRck vermieden, welcher auch alle Gingipaine hemmt (Sroka et al. 2001, Banbula et al. 1999).

Zum **Nachweis von Proteasen aus dem Gingivafluid** ist die Aktivitätsmessung dieser Enzyme weit verbreitet und terminaler Bestandteil verschiedener Methoden (Kennett et al. 1997, Figueredo und Gustafsson 1998). Auch Gazi et al. (1996) nutzten eine solche Versuchsanordnung, wiesen jedoch auf die mangelnde Spezifität der Aktivitätsmessung hin. Gerade Proteasen in höherer Konzentration oder mit stärkerer Aktivität könnten schwächere Enzyme durch konkurrierenden Substratabbau maskieren. Zwar gelten viele der Substrate als hochspezifisch (Eley und Cox 1996, Chen et al. 2000), die unschätzbare Vielfalt wirtseigener und mikrobieller Proteasen in der GCF (Eley und Cox 2003, Uitto et al. 2003) unterstützt jedoch den Vorschlag von Gazi et al. (1996), den Nachweis durch selektive Antikörper gegen das gesuchte Enzym zu erbringen. Derartige Antikörper kommen etwa bei Immunofluoreszenz-Assays (Chen et al. 2000), Radioimmuno-Assays (Söder et al. 2002) oder dem ELISA zum Einsatz. Letztere ist eine hochspezifische, praktikable Methode und wird bereits vielfach in der Erforschung der GCF-Proteasen eingesetzt, so beispielsweise beim Nachweis von MMPs (Söder 1999, Söder et al. 2002, Brungsberg 2009). Der quantitative Gingipain-Nachweis aus dem Sulkusfluid erfolgte 1996 von Eley und Cox mittels Aktivitätsmessung, diese konnten jedoch nicht zwischen den einzelnen Gingipainen differenzieren. Ein spezifischer quantitativer Nachweis mittels ELISA wurde nach eigenem Wissen bisher nur für RgpB durchgeführt (Kramesberger 2009) und konnte in der vorliegenden Studie nun auch für Kgp erbracht werden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Mikrobiologie der Proben

Von den fünf ausgewählten Bakterien dominierten deutlich jene des roten Komplexes, welche von Sokransky et al. (1998) vorrangig in parodontalen Taschen nachgewiesen worden sind. Der häufigste Erreger insgesamt war *T. forsythia*. Er wurde bei allen Patienten gefunden. Mit knapp 95% und 89% zeigten *P. gingivalis* und *T. denticola* ebenfalls eine hohe Prävalenz bei den Parodontitispatienten. Die Häufigkeit positiver Proben und die dabei gemessenen Keimzahlen stiegen bei allen drei Keimen mit zunehmender Sondierungstiefe an. Ähnliche Ergebnisse für *P. gingivalis* und *T. forsythia* erhielten etwa Lau et al. (2004) und Saygun et al. (2008), solche für *T. denticola* wurden von Asai et al. (2002) beschrieben. Träger von *A. actinomycetemcomitans* waren knapp 62% der hier untersuchten Patienten. Ein klarer Bezug zur Sondierungstiefe war dabei

nicht auszumachen. Für die Prävalenz des Keimes fanden Lau et al. (2004) weltweit eine Vielzahl unterschiedlicher Angaben in der Literatur, was die Problematik eines Vergleiches aufzeigt. Für alle vier Erreger liegen jedoch auch Studien des gleichen Institutes vor (Wegner 2007, Voigt 2007), welche sehr ähnliche Ergebnisse aufzeigen. *P. intermedia* war mit insgesamt 28% betroffener Patienten der seltenste nachgewiesene Keim. Eine Abhängigkeit von der Sondierungstiefe war kaum ersichtlich, was auch von anderen Untersuchungen beschrieben wurde (Doungudomdacha et al. 2001). Von vielen Autoren wird für dieses Bakterium jedoch eine höhere Prävalenz angegeben. Eine Übersichtsarbeit ergab dabei, dass durchschnittlich 50-63% der Patienten Träger des Keimes sind, wobei in diesen Studien nicht immer zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens* unterschieden werden konnte (Mombelli et al. 2002). Gerade für so eng verwandte Keime bietet die PCR eine höhere Spezifität als Kulturverfahren (Boutaga et al. 2006, Eick und Pfister 2002). Da aber auch andere, auf der Real-time PCR basierende Studien (Voigt 2007, Boutaga et al. 2006, Saygun et al. 2008) mehr *P. intermedia* in den Proben fanden, können methodische Fehler hier nicht ausgeschlossen werden. So konnten Noiri et al. (2001) Zellen des Keimes vor allem in Epithel-naher Plaque lokalisieren, während andere Bakterien auch in freier Plaque zu finden waren. Eine Probengewinnung mittels Waschtechnik könnte gerade solche Keime nur unzureichend wiedergeben.

Bei gesunden Probanden wurden lediglich *A. actinomycetemcomitans* (80% der Personen) und *T. forsythia* (60% der Personen) nachgewiesen. In der Literatur werden alle hier bestimmten Erreger immer wieder bei parodontal gesunden Personen gefunden, meist jedoch in weitaus geringerem Umfang als bei Parodontitispatienten (Lau et al. 2004, Boutaga et al. 2006). Die gemessenen Keimzahlen lagen auch hier alle unter 10^3 Keimen je Probe. Gerade für *A. actinomycetemcomitans* existieren mehrere Serotypen, denen unterschiedliche Pathogenität zugeschrieben wird. Die hier verwendeten Primer basieren auf der Spezies-spezifischen 16SrRNA und können solche Typen daher nicht unterscheiden.

Ein weiterer Punkt der Untersuchung war der Vergleich zwischen aggressiver und chronischer Parodontitis. Der einzige Keim, welcher bezogen auf Patienten, Proben und Keimzahlen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigte, war *P. gingivalis*. Er wurde insgesamt häufiger bei Patienten mit CP gefunden, allerdings konnte dieses Ergebnis statistisch nicht abgesichert werden. Die derzeitige Nomenklatur gibt keine

mikrobiologischen Kriterien zwischen beiden Krankheitsformen an. Auch Untersuchungen von Patientenproben zeigen zumindest für die generalisierten Varianten der Diagnosen, welche in der vorliegenden Studie berücksichtigt wurden, keinen klaren Zusammenhang mit bestimmten Erregern (Mombelli et al. 2002). Für *A. actinomycetemcomitans* scheint zumindest eine Assoziation zur lokalisierten aggressiven Parodontitis zu bestehen (Riep et al. 2009, Mombelli et al. 2002). Cortelli et al. (2005) wiesen diesbezüglich zudem auf starke geografische Unterschiede und die Tatsache, dass *A. actinomycetemcomitans* sehr häufig bei jüngeren Patienten zu finden ist, hin. Bei den eigenen untersuchten Patienten waren zumindest sehr hohe Keimzahlen nur bei AP-Patienten zu beobachten.

Abbau von IgG1 und IgG2 in der Sulkusflüssigkeit

Durchschnittlich 75% aller Immunglobuline des Menschen gehören der Klasse IgG an. Mit etwa 10 g/l werden die höchsten Konzentrationen im Blutserum gefunden. Bedeutende Mengen finden sich jedoch auch in der Extrazellulärflüssigkeit (Schütt und Bröker 2009). Die GCF leistet durch ihren enorm hohen Anteil an Immunkomponenten, darunter auch in großen Mengen solche der humoralen Abwehr, einen sehr wichtigen Beitrag zum Abwehrgeschehen in der Mundhöhle. Vor IgA ist auch hier IgG das häufigste Immunglobulin und vorrangig gegen Bakterien und Virulenzfaktoren aus der dentalen Plaque gerichtet (Ebersole 2003). Bereits 1981 wies Kilian jedoch darauf hin, dass ein Abbau der Immunglobuline in der GCF und Plaque einen großen Einfluss auf die Mengen der einzelnen Moleküle hat.

Die Untersuchungen von Vincents et al. zeigten, dass Kgp eines der Enzyme ist, welches IgG1 mit hoher Spezifität spaltet. Die Spaltstelle konnte im Gelenkbereich des Moleküls, der Hinge-Region, lokalisiert werden, genauer hinter der Aminosäure K222 (Lysin 222) der schweren Kette. Diese schweren Ketten haben nativ ein Molekulargewicht von ~ 50 kDa (Mohan 2001). Bei Spaltung durch Kgp entstanden Fragmente der Größen von etwa 30 und 20 kDa, wobei das größere von beiden C-terminalen Ursprungs ist. Dieses enthält die Fc-Region, an welcher die für IgG1 und IgG2 spezifischen und beim Western Blot eingesetzten Antikörper binden. Somit waren mit dem angewandten Verfahren im Falle einer Spaltung durch Kgp nur Banden im Bereich von ~ 30 kDa zu erwarten.

Ein solcher Abbau des IgG1 konnte insgesamt bei 67% der AP-Patienten und 44% der CP-Patienten festgestellt werden. Bezüglich der Proben lagen diese Werte bei 33% in der Gruppe mit AP und 19% in jener mit CP. Somit war die IgG1-Spaltung häufiger bei der aggressiven Parodontitis nachweisbar. Unterschiede zeigten sich auch beim Vergleich der Sondierungstiefen. So betrug der Anteil positiver Proben aus Sulci von maximal 3,5 mm ST bei beiden Diagnosen nur 6%. In tiefen Taschen (≥ 6 mm ST) hingegen lieferten die Hälfte der Proben von Patienten mit AP und ein Drittel derer mit CP Hinweise auf eine Spaltung des Moleküls. In den Western Blots der Kontrollgruppe waren derartige Banden nicht zu finden.

Die Korrelation des IgG1-Abbaus erwies sich jeweils als höchstsignifikant ($p < 0,001$) für das gleichzeitige Vorkommen von *P. gingivalis* und dessen Virulenzfaktor Kgp. So waren der Keim und dessen Protease beim Auftreten der gesuchten Fragmente auch stets vorhanden. Dennoch gab es zahlreiche Proben, bei denen trotz hoher Keimzahlen des Erregers keine Bande bei 30 kDa zu finden war, oder solche, bei denen trotz Abbaus von IgG1 kein Kgp nachweisbar war.

Dies lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit von Kgp immer mit einem Abbau von IgG1 verbunden ist. Wenn darüber hinaus aber viele Proben kein Kgp enthielten, obwohl die entsprechenden Fragmente vorhanden sind, so müssen entweder andere Enzyme die Spaltung verursacht haben, oder der Nachweis des Gingipains erfolgte nicht ausreichend.

Die **Ergebnisse des ELISA** zeigen hierbei, dass die **Protease Kgp** mit dieser Methode in der gingivalen Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Die Nachweisgrenze lag bei 0,01 ng/ml Probenflüssigkeit. Allerdings war das gesuchte Enzym nur bei 39% der Patienten und 12% der Proben in messbarer Konzentration vorhanden. Bei den gesunden Probanden war Kgp nicht zu finden. Dies geht konform mit den mikrobiologischen Ergebnissen, welche keine Infektion mit *P. gingivalis* in der Kontrollgruppe erkennen ließen. Bei den Parodontitisgruppen allerdings gab es 55% der Patienten und 59% ihrer Proben mit Vorkommen von *P. gingivalis*, aber ohne messbare Mengen des Gingipains. Auch Kgp-positive Proben zeigten eine weite Spanne an Konzentrationen, so gemessen von 0,07 – 10,98 ng/ml.

Unterschiede bezüglich Kgp bei Patienten mit AP und CP konnten lediglich für Proben aus tiefen Taschen gefunden werden. Hier zeigte sich eine Tendenz zu vermehrtem Vorkommen bei der aggressiven Variante der Erkrankung. Die gemessenen Konzentrationen variierten in beiden Gruppen in ähnlicher Größenordnung. *P. gingivalis* selbst dominierte eher bei der chronischen Parodontitis. Die aufgezeigte Tendenz müsste daher in vom Wirt begründeten Unterschieden der GCF beider Gruppen liegen. Eine genetisch bedingte und alterierte Abwehrlage bei Patienten mit aggressiven Formen von Parodontalerkrankungen könnte Einfluss auf die Bekämpfung des Virulenzfaktors haben, bedarf zur Klärung jedoch weiterer Untersuchungen.

In der bislang einzig bekannten und vergleichbaren Studie wurden durch ELISA mittlere Konzentrationen von 1,26 ng/ml des Gingipains RgpB je Probe gemessen (Kramesberger 2009). Diese Größenordnung ist vergleichbar mit den ermittelten Kgp-Konzentrationen. Allerdings gelang der Nachweis in dieser Studie mit 83% der Patienten und 49% der Stellen weitaus häufiger. Eine Ursache hierfür könnte in der Auswahl der Entnahmestellen für die GCF begründet sein. Zum Nachweis von RgpB wurden nur Taschen > 5 mm ST eingeschlossen, in der vorliegenden Studie auch solche mit geringeren Werten. Ein Vergleich der Sondierungstiefen zeigt dabei, dass Kgp erst ab 4 mm ST gefunden worden ist, bei Proben ≥ 6 mm immerhin zu 25%. Eine ebensolche Proportionalität zur Sondierungstiefe wies auch das Vorkommen von *P. gingivalis* auf, was die erwartete signifikante Korrelation ($p < 0,001$) zwischen dem Erreger und dessen Virulenzfaktor in der vorliegenden Studie unterstützt.

Eine weitere Ursache für den fehlenden Kgp-Nachweis trotz relevanter Keimzahlen liegt sehr wahrscheinlich in den zahlreichen Einflüssen begründet, welchen die Protease in der gingivalen Sulkusflüssigkeit ausgesetzt ist. Eventuelle Inhibitoren des Kgp würden hier kaum Einfluss haben, da immunologische Nachweismethoden nicht zwischen freier (aktiver) und gebundener (inaktiver) Protease differenzieren können (Figuerro und Gustafsson 1998). Zudem wurde gezeigt, dass gerade Kgp nicht von typischen humanen Proteinaseinhibitoren geblockt wird (Imamura et al. 1995) und viele davon auch von *P. gingivalis* abgebaut werden (Grenier 1996). Als Proteinstrukturen sind Gingipaine jedoch potentielle Substrate für andere wirtseigene oder mikrobielle Proteasen. Würden durch einen derartigen Abbau die Epitope zerstört, an welche die bei der ELISA verwendeten Antikörper binden, wäre der Nachweis unmöglich. Derartige Wechselwirkungen wurden

nach eigenem Wissen bisher nicht untersucht, sind jedoch zumindest für Enzyme phagozytischer Zellen sehr wahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass ein Großteil des im gingivalen Sulkus befindlichen Kgp an fixe Strukturen gebunden ist und somit nicht durch die Waschlösung ausgespült werden kann. So wurde erst vor kurzem gezeigt, dass die Gingipaine HRgpA und Kgp weitaus häufiger immobile, also Matrix-gebundene Wirtsproteine binden, als an deren in Körperflüssigkeiten gelöste Formen (Mc Alister et al. 2009). Beide Proteasen sind sowohl als Komplexe auf der Zelloberfläche des *P. gingivalis* lokalisiert, werden Vesikel-gebunden abgegeben oder frei sezerniert (Holt et al. 1999). Zumindest für die letztgenannten Formen könnte dies eine Rolle spielen. Die zellgebundene Variante, welche etwa 80% der Gingipaine ausmacht (Takii et al. 2005), müsste sich jedoch proportional zu den jeweiligen Keimzahlen in den Proben wieder finden.

Andere Ursachen könnten im ELISA selbst liegen. Hier werden Antikörper gegen Kgp eingesetzt, welche dieses binden. Zwar üben Gingipaine auf das Immunsystem des Parodontitispatienten einen starken antigenen Reiz aus, was an hohen IgG-Titern gegen diese Virulenzfaktoren erkennbar ist (Nakagawa et al. 2001, Gibson et al. 2005). Einige Autoren weisen aber auf die Möglichkeit hin, dass der Keim vor allem seine zellgebundenen HRgpA-Kgp-Komplexe vor diesen Antikörpern schützt. So wurde festgestellt, dass gerade die katalytischen (CAT-) Domänen in diesen Komplexen tief verborgen liegen und von den spezifischen IgGs erst nach Denaturation durch Hitze erkannt wurden (Inagaki et al. 2003). Auch die Polysaccharidkapsel einiger Stämme scheint die Erkennung durch Immunglobuline zu erschweren (Nakagawa et al. 2001).

Neben diesem möglicherweise eingeschränkten Kgp-Nachweis ist aber auch ein **Abbau des IgG1 durch weitere Enzyme von *P. gingivalis*** sehr wahrscheinlich. Bei den Untersuchungen von Vincents et al. blieb die schwere Kette des Moleküls auch nach 24-stündiger Inkubation mit Kgp in zwei Fragmente gespalten. In einer früheren Untersuchung wurde IgG mit ganzen Zellen oder Kulturüberstand des *P. gingivalis* inkubiert (Grenier et al. 1989). Hierbei entstanden zunächst Fragmente von 33 und 11 kDa, welche über einen Zeitraum von 32 Stunden sukzessive bis unter die Nachweisgrenze abgebaut wurden. Gleichzeitig wurden mittels SDS-PAGE mehrere Banden mit proteolytischer Aktivität gegen IgG aufgezeigt. Darüber hinaus wurde die Spaltung von IgA und IgG durch ein Arg-Gingipain beschrieben (Kadowaki et al. 1994). Bei dem

Enzym handelte es sich sehr wahrscheinlich um HRgpA, wofür eine detektierte 44 kDa-Bande spricht. Dies könnte der katalytischen Domäne oder einer HA-Domäne des Moleküls entsprechen (O'Brien-Simpson et al. 2001). Bei diesem Abbau entstanden mehrere Banden des gespaltenen IgG, besonders in den Regionen um 29-31 kDa und 33-35 kDa. Dies würde bedeuten, dass die Gingipaine das Molekül in größere Fragmente spalten, welche anschließend durch weitere Proteasen und Peptidasen zu kleineren Peptiden abgebaut werden. Diese Peptide durchwandern in der SDS-PAGE das Gel komplett und sind somit nicht mehr nachweisbar. Dies könnte also auch ein Grund sein, weshalb in einigen Proben keine Fragmente zu finden sind, obwohl *P. gingivalis* in hohen Keimzahlen nachgewiesen wurde.

In einer Protease-reichen Flüssigkeit wie der GCF sind an diesem Vorgang jedoch mit Sicherheit auch **Enzyme anderer Herkunft** beteiligt. Mehrere Studien befassten sich diesbezüglich in der Vergangenheit mit oralen Erregern. So fanden Kilian et al. (1981), dass die getesteten Vertreter der Spezies *Capnocytophaga* das IgG-Molekül in Fab und Fc-Fragmente spalteten, während Stämme von *P. gingivalis* und *P. intermedia* dieses komplett abbauten. Sundqvist et al. (1985) fanden einen totalen Abbau des IgG bei Stämmen von *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *P. loeschei*, sowie einen starken Abbau durch *P. endodontalis*. Kein Abbau hingegen war in dieser Studie durch Stämme von *P. asaccharolytica* zu sehen. Auch Grenier et al. (1989) untersuchten den IgG-Abbau durch schwarz pigmentierte *Bacteroides* und fanden neben den bereits erwähnten Ergebnissen für *P. gingivalis* Spaltstücke von 33 kDa nach Inkubation mit *P. asaccharolytica*, *P. intermedia* sowie *P. loeschei*. Mehr Keime wurden in einer Untersuchung von Jansen et al. (1994) eingeschlossen. Hier zeigte sich ein starker Abbau durch *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. oralis* und *P. endodontalis*. Die partielle Spaltung des IgG konnte für *P. asaccharolytica* und *E. nodatum* festgestellt werden. Andere Vertreter wie *A. actinomycetemcomitans* und *T. denticola* beeinflussten den Antikörper nicht. In einer Studie zum Immunglobulin-Abbau bei lokaler aggressiver Parodontitis kamen Gregory et al. (1992) jedoch zu Ergebnissen, welche neben *P. gingivalis* und *C. ochracea* auch für *A. actinomycetemcomitans* die Fähigkeit zur Spaltung von IgG aufzeigten. Für orale Abszesse wurde schließlich ein Zusammenhang zwischen Keimdichte und Immunglobulinabbau beschrieben. Die Autoren sahen den Antikörperabbau dabei im Zusammenhang mit PMNs und bestimmten Bakterien. Hierunter wieder *P. gingivalis* und *P. intermedia*, aber auch *A. meyeri* (Jansen et al. 1996).

In der vorliegenden Studie korrelierte der gesuchte Abbau der schweren Kette von IgG1 höchstsignifikant ($p < 0,001$) mit den Keimzahlen von *P. gingivalis* und *P. intermedia* sowie hochsignifikant ($p < 0,01$) mit jenen von *T. forsythia*. Im Vergleich mit den oben genannten Autoren kann daher geschlossen werden, dass *P. gingivalis* und *P. intermedia* einen großen Anteil am Abbau von IgG in der GCF von Parodontitispatienten haben. Ähnlich wie *P. gingivalis* scheint *P. intermedia* dabei mehrere Enzyme, darunter vor allem Cystein-Proteasen zu besitzen, welche IgG binnen 24-stündiger Inkubation in-vitro komplett in niedermolekulare Peptide zerlegen (Jansen et al. 1995). Hierzu passt die eigene Beobachtung, dass beim Vorkommen hoher Keimzahlen von *P. intermedia* neben der 30 kDa-Bande auch eine Vielzahl anderer, unscharf abgrenzbarer Banden in den Western Blots erkennbar war. Allerdings traf dies auch für etliche Proben mit hoher Belastung durch *T. forsythia* zu. Dieses Bakterium wurde in keine der oben genannten Untersuchungen bezüglich des Abbaus von Immunglobulinen eingeschlossen, besitzt jedoch wie *P. intermedia* und *P. gingivalis* Serin- und Cysteinproteasen (Potempa et al. 2000, Hamlet et al. 2008). Zudem produziert der Keim mehrere Glykosidasen, welche unter anderem beim Abbau von Glykoproteinen beteiligt sind (Hughes et al. 2003). Als derartige Glykoproteine besitzen auch Immunglobuline Kohlenhydrat-Seitenketten an der schweren Kette. Bedeutung besitzen diese wohl bei der Ligandenbindung und Strukturgebung. Verlust des Oligosaccharidrestes ändert die Konformation des Moleküls und macht es anfälliger für proteolytische Spaltung (Jefferis 1990a). Dies könnte die gefundene Assoziation zwischen *T. forsythia* und der IgG1-Spaltung erklären. Bei der Inkubation ganzer Zellen von *T. denticola* mit IgG konnten weder Jansen et al. (1994) noch Hollmann und Van der Hoeven (1999) einen Abbau finden. In einer ähnlichen Untersuchung zeigte sich aber, dass die Vorbehandlung des Antikörpers mit einer bakteriellen Glykosidase dessen schwere Kette für *T. denticola* angreifbar macht. Es entstanden dabei Fragmente von 25 und 14 kDa (Grenier und Mayrand 2001). Bei den hier vorliegenden Ergebnissen wurden nur Proben mit Banden von 30 kDa in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Somit erklärt sich, dass in der vorliegenden Untersuchung keine Korrelation zwischen dem Abbau der schweren Kette von IgG1 und dem Vorkommen von *T. denticola* ersichtlich ist. Der Keim ist aber vorrangig in tiefen parodontalen Taschen zu finden (Ellen und Galimanas 2005), welche eine Vielzahl an Bakterien enthalten. Durch die dabei vertretenen Glykosidase-produzierende Bakterien, etwa den häufig koaggregierenden *T. forsythia*, trägt sehr wahrscheinlich auch *T. denticola* zum Antikörperabbau bei. Die Spaltung der schweren Kette von IgG durch Proteasen von *A. actinomycetemcomitans*,

welche Gregory et al. (1992) beschrieben, ergab Banden von 29-30 kDa und 33 kDa. Das Auftreten solcher Banden in den hier untersuchten Proben stand jedoch nicht in signifikantem Zusammenhang mit dem Vorkommen des Keimes. Diese Diskrepanzen könnten in unterschiedlicher proteolytischer Potenz verschiedener Stämme begründet sein, zumal auch Jansen et al. (1994) keinen IgG-Abbau durch *A. actinomycetemcomitans* fanden. Andererseits könnten die Fragmente in der GCF auch weiter abgebaut worden und daher nicht mehr nachweisbar sein.

Neben den bakteriellen Proteasen ist die GCF auch reich an **wirtseigenen Enzymen**, welche beim Abbau von Immunglobulinen eine Rolle spielen. Darunter konnten die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) 2, 3, 7, 9 und 12, humane neutrophile Elastase (HNE), Cathepsin G und Plasmin als IgG-spaltende Enzyme identifiziert werden. HNE spaltet dabei die schwere Kette von IgG nur im Abstand von einer Aminosäure verglichen mit der Spaltstelle von Kgp. Plasmin nutzt sogar die gleiche Spaltstelle (Ryan et al. 2008, Vincents et al. unveröffentlicht). Somit können Teile der 30 kDa-Fragmente auf Proteolyse durch derartige wirtseigene Enzyme begründet sein.

Bei den erwähnten Studien zum Abbau von IgG durch weitere Enzyme von *P. gingivalis* sowie weitere bakterielle und humane Proteasen muss aber letztlich bedacht werden, dass die Proben oder IgG-Präparate zur Vorbereitung der SDS-PAGE stets einzeitig, also gleich mit reduzierendem Puffer, erhitzt wurden. Dies kann in einigen Fällen zu einer ungewollten Spaltung von Peptidbindungen führen (Deutsch 1976) und damit einen Abbau der Moleküle vortäuschen. Um dieses Risiko zu minimieren, wurden die eigenen Proben in Anlehnung an das Vorgehen von Vincents (2006) zweizeitig erhitzt (vergleichend dazu Kap. 4.4.2 und 6.1). Dies könnte eine Ursache zwischen bestehenden Differenzen bei den Ergebnissen der verschiedenen Autoren, so etwa bezüglich des Abbaus von IgG durch *A. actinomycetemcomitans*, sein. Ebenso könnten die zahlreichen Fragmente, welche Kadowaki et al. (1994) bei der Spaltung von IgG durch das Arg-Gingipain erhielten, zum Teil durch die Probenaufbereitung verursacht sein. Daher sollte dieser Aspekt in zukünftigen Untersuchungen auf diesem Gebiet berücksichtigt werden.

In den hier vorliegenden Ergebnissen waren mikrobiologisch keine deutlichen **Unterschiede zwischen AP und CP** ersichtlich. Dennoch zeigte der IgG1-Abbau eine Tendenz zu vermehrtem Vorkommen bei Patienten mit AP. Die extrazelluläre HNE-

Aktivität neutrophiler Granulozyten ist bei Parodontitispatienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen generell erhöht (Guentsch et al. 2009). In einer Studie zum Vergleich der PMN-Aktivität zwischen Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis zeigte sich jedoch, dass diese bei der aggressiven Variante der Erkrankung überwiegen. Dementsprechend galt dies auch für die Konzentration von HNE in der GCF (Buchmann et al. 2002). Derartige wirtseigene Faktoren könnten eine Ursache für die Differenzen bezüglich des IgG1-Abbaus (bezogen auf die Hinge-Region) zwischen den Patientengruppen sein. Auch die Beobachtung des vermehrten Kgp-Nachweises bei AP-Patienten könnte eine Rolle spielen.

Von den **vier Subklassen des IgG** konnte Kgp nur IgG1 spalten (Vincent et al. unveröffentlicht). Eine Inkubation des Kulturüberstandes von *P. gingivalis* mit den Molekülen zeigte aber eine Spaltung aller vier Subklassen (Gregory et al. 1992). In der vorliegenden Studie waren im Falle von IgG2 keine Banden der Größe von 30 kDa zu finden. Oft konnten jene der ganzen schweren Kette gesehen werden und vereinzelt solche anderer Größen. Generell erschienen die Banden dabei in fast allen Western Blots schwächer als jene von IgG1. Dies kann bedeuten, dass die Moleküle entweder in niedrigerer Konzentration vorliegen als IgG1 und weniger abgebaut werden, oder dass sie stärkerem Abbau unterliegen und die Molekulargewichte der entstehenden Peptide unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Die Levels der IgG-Subklassen in der Sulkusflüssigkeit von Patienten mit chronischer Parodontitis zeigten Konzentrationen von $2,4 \pm 3,4$ g/l für IgG1, $2,9 \pm 6,4$ g/l für IgG2, $0,1 \pm 0,1$ g/l für IgG3 und $0,8 \pm 1,3$ g/l für IgG4 (Wilton et al. 1993). Untersuchungen von gingivalem Gewebe zeigten zum einen IgG4 als dominante Subklasse, in einer anderen Studie war die Reihenfolge $\text{IgG1} > \text{IgG2} > \text{IgG3} \geq \text{IgG4}$ (Ebersole 2003). Hier könnte der Hinweis von Kilian (1981) eine Rolle spielen und die Subklassenverteilung durch Site-spezifische proteolytische Aktivität verändert sein. Booth et al. (2006) weisen zudem auf weitere Faktoren hin, welche die Subklassenverteilung beeinflussen könnten. Darunter sind die Natur des Antigens, die Spezifität des Erregers, die Genetik des Wirtes, die Diagnose und externe Einflüsse, etwa das Rauchen. Unterschiede zwischen den IgG-Subklassen bei Patienten mit AP und CP wurden von Takeuchi et al. 2006 untersucht, wobei *P. gingivalis* als antigene Determinante diente. Insgesamt konnte dabei festgestellt werden, dass anhand der Subklassen nicht zwischen genereller und lokalisierter AP sowie CP unterschieden

werden kann. Vorherrschender Antikörper gegen Zellen des Keims war IgG1. Dieser Antikörper ist vorrangig gegen Proteinstrukturen gerichtet, wie etwa die Gingipaine von *P. gingivalis*. IgG2 wird dagegen durch Kohlenhydrat-Antigene induziert, wozu Lipopolysaccharide und Polysaccharidkapseln der Bakterien zählen. Aber auch repetitive Sequenzen von Proteinstrukturen, wie sie beispielsweise in Gingipainmolekülen auftreten, rufen eine IgG2-Antwort hervor (Booth et al. 2006). Besonders bedeutend ist jedoch die biologische Funktion beider Antikörper. Während IgG1 ein starker Aktivator des Komplementsystems ist und über alle drei Fc_γ-Rezeptoren Phagozyten und andere Effektorzellen anregt, hat IgG2 von all diesen Funktionen lediglich eine sehr geringe Bedeutung bei der Komplementaktivierung (Jefferis 1990b, Fridman 1997). Am Beispiel der Gingipaine konnten Booth et al. (2006) zeigen, dass IgG1 und IgG2 gegen diese Virulenzfaktoren gebildet werden. O'Brien-Simpson et al. (2000) fanden diesbezüglich folgende Subklassen-Verteilung: IgG4>IgG2>IgG3=1. Würden die Gingipaine die für *P. gingivalis* gefährlichen IgG1-Antikörper abbauen und die unwirksamen IgG2-Moleküle nicht beeinträchtigen, könnten diese als Maskierung der Virulenzfaktoren dienen. Einige Autoren weisen auf die Beobachtung hin, dass viele Antikörper gegen die HA-Domänen der Gingipaine gerichtet sind, jedoch die Infektion mit dem Erreger nicht bekämpfen können. Die CAT-Domänen induzieren scheinbar weniger Antikörper. In diesem Zusammenhang werden die HA-Domänen als Antikörperfallen bezeichnet (Potempa et al. 2000, Inagaki et al. 2003). Unterschiede bezüglich der IgG-Subklassen gegen diese Domänen und deren Abbau durch die Proteasen wären hierbei interessant, zumal Gingipaine auch als viel versprechende Komponenten von Impfstoffen gegen Parodontitis angesehen werden (Nakagawa et al. 2001, Yokoyama et al. 2007).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der Abbau von IgG1 und anderen Immunglobulinen in der Sulkusflüssigkeit nicht durch einzelne Keime oder Virulenzfaktoren, sondern durch das Zusammenspiel zahlreicher bakterieller und wirtseigener Enzyme bedingt ist. Deren Vielfalt und Menge nehmen mit steigender Taschentiefe zu, ebenso wohl die Antikörperproduktion und -spaltung. Hierbei bieten die beteiligten Keime für sich selbst und koaggregierende Spezies Schutz vor dem spezifischen Abwehrsystem. Gleichzeitig liefert der Abbau dieser Glykoproteine niedermolekulare und damit gut verwertbare Nährstoffe (Jansen et al. 1994). Dies fördert das Wachstum des dentalen Biofilms und damit die Destruktion des Parodonts. Allein aus diesem Aspekt der Wirkung proteolytischer Enzyme sollte die Hemmung derartiger Virulenzfaktoren von besonders

aktiven Keimen wie *P. gingivalis* und *P. intermedia* als zukünftiger Therapieansatz in Erwägung gezogen werden. Neben der Möglichkeit von Impfstoffen (Nakagawa et al. 2001) könnten hier auch künstliche oder biologische Inhibitoren zum Einsatz kommen (Bania et al. 2008). In diesem Zusammenhang ist der spezifische Nachweis solcher Enzyme in der GCF von Bedeutung. Der ELISA kann dabei je nach Zielstellung von Vorteil gegenüber Methoden mit Aktivitätsmessung sein.

7 Schlussfolgerungen

Immunglobuline unterliegen im gingivalen Sulkus einem massiven Abbau. Besonders IgG1, weniger IgG2 wird proteolytisch gespalten. Der Abbau erfolgt dabei stufenweise und erzeugt neben den detektierten Spaltstücken wohl auch Peptide, welche aufgrund ihrer geringen Molekulargewichte mit der angewandten Methode nicht mehr nachgewiesen werden können.

Für die Spaltung der Immunglobuline sind bakterielle und wirtseigene Proteasen verantwortlich. Im Falle der Parodontitis haben stark proteolytische Erreger wie *P. gingivalis* und *P. intermedia* großen Einfluss. Zudem spielen Bakterien wie *T. forsythia*, welche neben Proteasen auch Glykosidasen produzieren, eine Rolle beim Abbau dieser Glykoproteine.

Der genaue Einfluss von einzelnen Virulenzfaktoren ist in vivo schwer zu beurteilen. Dennoch muss im Falle von Gingipain K davon ausgegangen werden, dass dieses Enzym in der Lage ist, durch den ersten Schritt einer IgG1-Spaltung den Weg für weiteren Abbau durch andere Proteasen der GCF zu ermöglichen. Der hochspezifische quantitative Nachweis von Kgp in der GCF ist mittels ELISA möglich

Der Abbau von IgG1 kommt vermehrt bei der aggressiven Parodontitis vor, Wirtsfaktoren könnten hier von Bedeutung sein.

Mit zunehmender Sondierungstiefe steigen die Vielfalt und Menge der parodontopathogenen Keime, meist zudem der Entzündungsgrad des parodontalen Gewebes. Hierdurch nimmt die Zahl der Antikörper, aber auch die der Immunglobulin-spaltenden Enzyme zu, was zu deren vermehrtem Abbau führt.

8 Literaturverzeichnis

- Aida J, Ando Y, Akhter R, Aoyama H, Masui M, Morita M. 2006. Reasons for permanent tooth extractions in Japan. *J Epidemiol*, 16(5): 214-219.
- Alugupalli KR, Kalfas S, Edwardsson S, Forsgren A, Arnold RR, Naidu AS. 1994. Effect of lactoferrin on interaction of *Prevotella intermedia* with plasma and subepithelial matrix proteins. *Oral Microbiol Immunol*, 9(3):174-179.
- Alugupalli KR, Kalfas S. 1995. Inhibitory effect of lactoferrin on the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* to fibroblasts and epithelial cells. *APMIS*, 103(2):154-160.
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*, 39(2):136-142.
- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4:1-6.
- Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. 2002. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 40(9):3334-3340.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 11(4):266-273.
- Asikainen S, Chen C. 1999. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000, 20:65-81.
- Banbula A, Bugno M, Kuster A, Heinrich PC, Travis J, Potempa J. 1999. Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 261(3):598-602.
- Bania J, Kubiak A, Wojtachnio K, Polanowski A. 2008. Pancreatic secretory trypsin inhibitor acts as an effective inhibitor of cysteine proteinases gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 43(2): 232-236.
- Bascones-Martinez A, Figuero-Ruiz E. 2005. Periodontal diseases as bacterial infection. *Av Periodon Implantol*, 17(3): 111-118.
- Birkedal-Hansen H, Taylor RE, Zambon JJ, Barwa PK, Neiders ME. 1988. Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res*, 23(4):258-264.
- Booth V, Solakoglu O, Bavisha N, Curtis MA. 2006. Serum IgG1 and IgG2 antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 21(2): 93-99.
- Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. 2006. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*, 33(6): 427-433.
- Brecx MC, Fröhlicher I, Gehr P, Lang NP. 1988. Stereological observations on long-term experimental gingivitis in man. *J Clin Periodontol*, 15(10): 621-627.
- Brungsberg B. 2009. Einfluss von antimikrobiell wirksamen Substanzen auf die Freisetzung von Matrixmetallproteinase aus Fibroblasten nach Kontakt mit parodontopathogenen Keimen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Buchmann R, Hasilik A, Van Dyke TE, Lange DE. 2002. Amplified crevicular leukocyte activity in aggressive periodontal disease. *J Dent Res*, 81(10):716-721.

- Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J. 1998. Inactivation of tumor necrosis factor- α by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 273(12):6611-6614.
- Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mäntylä P, Rönkä H, Sorsa T. 2000. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 27(5):366-369.
- Chen YF, Yan J, Zhang DY, Chen LL. 2008. Effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on induced secretion of inflammatory cytokines by different cell lines. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 37(6):622-628.
- Chi B, Qi M, Kuramitsu HK. 2003. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol*, 154(9):637-643.
- Choi JI, Kang HS, Park YM, Kim SJ, Kim US. 2004. Identification of T-cell epitopes of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock-protein 60 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 19(1):1-5.
- Chu L, Ebersole JL, Kurzban GP, Holt SC. 1999. Cystalysin, a 46-kDa L-cysteine desulfhydrase from *Treponema denticola*: biochemical and biophysical characterization. *Clin Infect Dis*, 28(3):442-450.
- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. 2005. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32(8):860-866.
- Cutler CW, Arnold RR, Schenkein HA. 1993. Inhibition of C3 and IgG proteolysis enhances phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol*, 151:7016-7029.
- DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. 1997. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*, 76(6):1260-1270.
- Delima AJ, Van Dyke TE. 2003. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31:55-76.
- Deng QD, Han Y, Xia X, Kuramitsu HK. 2001. Effects of the oral spirochete *Treponema denticola* on interleukin-8 expression from epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol*, 16(3):185-187.
- Deutsch DG. 1976. Effect of prolonged 100 degrees C heat treatment in sodium dodecyl sulfate upon peptide bond cleavage. *Anal Biochem*, 71(1):300-303.
- Deutzmann R, Bruckner-Tudermann L, Bruckner P. 2007. Binde-und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. Achte Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag, 715-754.
- Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A. 1998. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*, 66(12):6054-6057.
- Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CWI. 2001. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol*, 28:437-445.
- Ebersole JL. 2003. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000*, 31: 135-166.
- Eick S, Pfister W. 2002. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*, 29(7):638-644.
- Eick S, Reissmann A, Rödel J, Schmidt KH, Pfister W. 2006. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol*, 21(4):231-237.

- Eley BM, Cox SW. 1996. Correlation between gingivain/gingipain and bacterial dipeptidyl peptidase activity in gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients. A 2-year longitudinal study. *J Periodontol*, 67(7):703-716.
- Eley BM, Cox SW. 2003. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31:105-124.
- Ellen RP, Galimanas VB. 2005. Spirochetes at the forefront of periodontal infections. *Periodontol 2000*, 38:13-32.
- Fenno JC, Lee SY, Bayer CH, Ning Y. 2001. The opdB locus encodes the trypsin-like peptidase activity of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 69(10):6193-6200.
- Figuerro CM, Gustafsson A. 1998. Protease activity in gingival crevicular fluid: presence of free protease. *J Clin Periodontol*, 25(4):306-310.
- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. 2007. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*, 45(12): 3859-3869.
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*, 20:136-167.
- Flemmig TF. 1999. Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4: 32-37.
- Frandsen EVG, Reinholdt J, Kilian M. 1991. Immunoglobulin A1 (IgA1) proteases from *Prevotella* (bacteroides) and *Capnocytophaga* species in relation to periodontal diseases. *J Periodont Res*, 26:297-299.
- Fridman WH. 1997. Structure and function of immunoglobulins. In: Fridman WH, Sautes C. *Molecular biology intelligence unit: cell-mediated effects of immunoglobulins*. Erste Aufl. New York [u.a.]: Springer Verlag [u.a.], 1-28.
- Gazi MI, Cox SW, Clark DT, Eley BM. 1996. A comparison of cysteine and serine proteinases in human gingival crevicular fluid with tissue, saliva and bacterial enzymes by analytical isoelectric focusing. *Arch Oral Biol*, 41(5):393-400.
- Gazi MI, Cox SW, Clark DT, Eley BM. 1997. Characterization of protease activities in *Capnocytophaga* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp., *Treponema denticola* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*, 12(4):240-248.
- Genco JR. 1996. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 67(10):1041-1049.
- Gibson FC 3rd, Savelli J, Van Dyke TE, Genco CA. 2005. Gingipain-specific IgG in the sera of patients with periodontal disease is necessary for opsonophagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 76(10): 1629-1636.
- Glockmann E, Köhler J. 1998. Ursachen für Zahnextraktionen in den neuen Bundesländern. *Dtsch Zahnärztl Z*, 53: 39-41.
- Goodson JM. 2003. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol 2000*, 31:43-54.
- Gregory RL, Kim DE, Kindle JC, Hobbs LC, Lloyd DR. 1992. Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res*, 27(3):176-183.
- Grenier D. 1996. Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Microbiology*, 142 (4):955-961.
- Grenier D, Mayrand D, McBride BC. 1989. Further studies on the degradation of immunoglobulins by black-pigmented *Bacteroides*. *Oral Microbiol Immunol*, 4(1): 12-18.
- Grenier D, Mayrand D. 2001. Cleavage of human immunoglobulin G by *Treponema denticola*. *Anaerobe*, 7:1-4.

- Grenier D, Uitto VJ, McBride BC. 1990. Cellular location of a *Treponema denticola* chymotrypsinlike protease and importance of the protease in migration through the basement membrane. *Infect Immun*, 58(2):347-351.
- Griffiths GS. 2003. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31:32-42.
- Guan SU, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ. 2008. *Prevotella intermedia* induces matrixmetalloproteinase-9 expression in human periodontal ligament cells. *FEMS Microbiol Lett*, 283:47-53.
- Guentsch A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. 2006. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodontal Res*, 41(3):184-188.
- Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, Eick S. 2009. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*, 44(3):368-377.
- Gustafsson A. 1996. Methodological considerations in GCF sampling with paper strips: poor recovery of uncomplexed elastase. *J Clin Periodontol*, 23:432-436.
- Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Garcés CP, Román-Alvárez P, Barajas-Torres C, Contreras-Marmolejo LA. 2007. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization. *Cell Biol Int*, 31(9):1063-1068.
- Haase EM, Zmuda JL, Scannapieco FA. 1999. Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 67(6):2901-2908.
- Haffajee AD, Sokransky SS. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5:78-111.
- Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT, Sharma A, Schifferle RE, DeNardin E, Russell MW, Genco RJ. 2002. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(2):403-411.
- Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. 1998. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 13(3):129-138.
- Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, Narayanan D, Davies R, Seymour G. 2004. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res*, 83(3):232-235.
- Hamlet SM, Ganashan N, Cullinan MP, Westerman B, Palmer JE, Seymour GJ. 2008. A 5-year longitudinal study of *Tannerella forsythia* prfH genotype: association with loss of attachment. *J Periodontol*, 79(1):144-149.
- Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, Ishikura H, Golenbock DT, Sugaya T, Tsuchida N, Kawanami M, Hara Y, Shibata K. 2004. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun*, 72(3):1318-1325.
- Hashimoto M, Ogawa S, Asai Y, Takai Y, Ogawa T. 2003. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. *FEMS Microbiol Lett*, 226(2):267-271.
- Hasilik A. 2007. Biosynthese, Modifikation und Abbau von Proteinen. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. Achte Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag, 285-324.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. 2003. Einführung in die Zahnerhaltung. Dritte Aufl. München und Jena: Urban & Fischer Verlag, 351-367.

- Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. 2003. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol*, 57:29-55.
- Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. 1987. *Biologie für Mediziner, Pharmazeuten und Chemiker*. Erste Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 285-288.
- Hofmann E. 2001a. *Medizinische Biochemie systematisch*. Dritte Aufl. Bremen [u.a.]: UNI-MED Verlag, 505-535.
- Hofmann E. 2001b. *Medizinische Biochemie systematisch*. Dritte Aufl. Bremen [u.a.]: UNI-MED Verlag, 388-427.
- Hofmann E. 2001c. *Medizinische Biochemie systematisch*. Dritte Aufl. Bremen [u.a.]: UNI-MED Verlag, 28-49.
- Hofmann E. 2001d. *Medizinische Biochemie systematisch*. Dritte Aufl. Bremen [u.a.]: UNI-MED Verlag, 77-97.
- Hollmann R, Van der Hoeven HJ. 1999. Inability of intact cells of *Treponema denticola* to degrade human serum proteins IgA, IgG and albumin. *J Clin Periodontol*, 26(7):477-479.
- Holt SC, Ebersole JL. 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, 38:72-122.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*, 20:168-238.
- Hughes CV, Malki G, Loo CY, Tanner AC, Ganeshkumar N. 2003. Cloning and expression of alpha-D-glucosidase and N-acetyl-beta-glucosaminidase from the periodontal pathogen, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*). *Oral Microbiol Immunol*, 18(5):309-312.
- Hugoson A, Norderyd O. 2008. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years?. *J Clin Periodontol*, 35(8):338-345.
- Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK. 2004. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 72(8):4619-4627.
- Imamura T. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74(1):111-118.
- Imamura T, Banbula A, Pereira PJ, Travis J, Potempa J. 2001. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (Gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 276(22):18984-18991.
- Imamura T, Potempa J, Pike RN, Moore JN, Barton MH, Travis J. 1995. Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: implications for bleeding tendency at periodontitis sites. *Infect Immun*, 63(12):4877-4882.
- Inagaki S, Ishihara K, Yasaki Y, Yamada S, Okuda K. 2003. Antibody responses of periodontitis patients to gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 74(10):1432-1439.
- Inagaki S, Onishi S, Kuramitsu HK, Sharma A. 2006. *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*". *Infect Immun*, 74(9):5023-5028.
- Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, Sogawa CA, Asaumi J, Kokeguchi S, Fukui K. 2003. Biofilm formation by a fimbriae-deficient mutant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol Immunol*, 47(11):877-881.
- Ishihara K, Okuda K. 1999. Molecular pathogenesis of the cell surface proteins and lipids from *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol Lett*, 181(2):199-204.

- Ishikura H, Arakawa S, Nakajima T, Tsuchida N, Ishikawa I. 2003. Cloning of the *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) *siaHI* gene and purification of the sialidase enzyme. *J Med Microbiol*, 52(Pt 12):1101-1107.
- Jagels MA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE. 1996. Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 64(6):1984-1991.
- Jansen HJ, Grenier D, Van der Hoeven JS. 1995. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*, 10(3):138-145.
- Jansen HJ, van der Hoeven JS. 1997. Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *Actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein-cleaving oral bacteria in serum. *J Clin Periodontol*, 24(5):346-353.
- Jansen HJ, van der Hoeven JS, van den Kieboom CW, Göertz JH, Camp PJ, Bakkeren JA. 1994. Degradation of immunoglobulin G by periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 9(6):345-351.
- Jansen HJ, van der Hoeven JS, Walji S, Göertz JH, Bakkeren JA. 1996. The importance of immunoglobulin-breakdown supporting the growth of bacteria in oral abscesses. *J Clin Periodontol*, 23(8):717-723.
- Jefferis R. 1990a. Molecular structure of human IgG subclasses. In: Shakib F, Hrsg. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Erste Aufl. Oxford: Pergamon Press, 15-30.
- Jefferis R. 1990b. Structure-function relationship of IgG subclasses. In: Shakib F, Hrsg. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Erste Aufl. Oxford: Pergamon Press, 93-108.
- Jeong SJ, Yee ST, Jo WS, Yu SH, Lee SH, Lim YJ, Yoo YH, Kim JM, Lee JD, Jeong MH. 2000. A novel factor isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates mouse B cells and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*, 68(9):5132-5138.
- Johnson RB, Streckfus CF, Dai X, Tucci MA. 1999. Protein recovery from several paper types used to collect gingival crevicular fluid. *J Periodont Res*, 34(6):283-289.
- Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K. 1994. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 269(33): 21371-21378.
- Kamaguchi A, Ohyama T, Sakai E, Nakamura R, Watanabe T, Baba H, Nakayama K. 2003. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. *Microbiology*, 149(Pt 5):1257-1264.
- Kang P, Korostoff J, Volgina A, Grzesik W, DiRienzo JM. 2005. Differential effect of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on co-cultures of human oral cells. *J Med Microbiol*, 54(Pt 8): 785-794.
- Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. 2001. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun*, 69(9):5375-5384.
- Kennett CN, Cox SW, Eley BM. 1997. Investigations into the cellular contribution to host tissue proteases and inhibitors in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 24(6): 424-431.
- Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. 1995. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at

- different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontal Res*, 30(5):332-341.
- Kilian M. 1981. Degradation of immunoglobulins A1, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect Immun*, 34(3):757-765.
- Kinane DF. 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000, 25:8-20.
- Kinane DF, Mooney J, Ebersole JL. 1999. Humoral immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 20:289-340.
- Kobayashi T, van der Pol WL, van de Winkel JG, Hara K, Sugita N, Westerdaal NA, Yoshie H, Horigome T. 2000. Relevance of IgG receptor IIIb (CD16) polymorphism to handling of *Porphyromonas gingivalis*: implications for the pathogenesis of adult periodontitis. *J Periodont Res*, 35(2):65-73.
- Kolenbrander PE, London J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*, 175 (11):3247-3252.
- Kornman KS. 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: A new look. *J Periodontol*, 79(8):1560-1568.
- Kowit JD, Maloney J. 1982. Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis. *Anal Biochem*, 123:86-93.
- Kramesberger M. 2009. Vergleich verschiedener Entnahmefethoden zur Analytik von Gingivafluid [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Kubo K. 1995. Effect of incubation of solutions of proteins containing dodecyl sulfate on the cleavage of peptide bonds by boiling. *Anal Biochem*, 225:351-353.
- Labbe S, Grenier D. 1995. Characterization of the human immunoglobulin G fc-binding activity of *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*, 63(7): 2785–2789.
- Laine ML, Appelmek BJ, van Winkelhoff AJ. 1997. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J Dent Res*, 76(12):1840-1844.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4):1244-1263.
- Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. 2008. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*, 139:19S-24S.
- Lang N, Bartold PM, Cullinan M. 1999. Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol*, 4:53.
- Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*, 31:1061-1069.
- Laxman VK, Annaji S. 2008. Tobacco use and its effects on the periodontium and periodontal therapy. *J Contemp Dent Pract*, 9(7):97-107.
- Lee VH, Dunbar BS. 1994. Sample preparation for protein electrophoresis and transfer. In: Dunbar BS, Hrsg. *Protein Blotting a practical approach*. Erste Aufl. Oxford: Oxford University Press, 87-103.
- Lee W, Pankoski L, Zekavat A, Shenker BJ. 2004. *Treponema denticola* immunoinhibitory protein induces irreversible G1 arrest in activated human lymphocytes. *Oral Microbiol Immunol*, 19(3):144-149.
- Leung KP, Fukushima H, Sagawa H, Walker CB, Clark WB. 1989. Surface appendages, hemagglutination, and adherence to human epithelial cells of *Bacteroides intermedius*. *Oral Microbiol Immunol*, 4(4):204-210.

- Leung KP, Fukushima H, Nesbitt WE, Clark WB. 1996. *Prevotella intermedia* fimbriae mediate haemagglutination. *Oral Microbiol Immunol*, 11(1):42-50.
- Lindhe J, Ranney R, Lamster I. 1999. Consensus report: chronic periodontitis. *Ann Periodontol*, 4:38.
- Listgarten MA. 1986. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 13: 418-425.
- Löffler G. 2003. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Fünfte Aufl. Berlin [u.a.]: Springer-Verlag, 571-599.
- Lúcia LF, Farias FF, Eustáquio CJ, Auxiliadora M, Carvalho R, Alviano CS, Farias LM. 2002. Bacteriocin production by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the oral cavity of humans with periodontal disease, periodontally healthy subjects and marmosets. *Res Microbiol*, 153(1):45-52.
- Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol*, 38(6):2362-2365.
- Mäkinen PL, Mäkinen KK, Syed SA. 1995. Role of the chymotrypsin-like membrane-associated proteinase from *Treponema denticola* ATCC 35405 in inactivation of bioactive peptides. *Infect Immun*, 63(9):3567-3575.
- Mättö J, Asikainen S, Väisänen ML, Rautio M, Saarela M, Summanen P, Finegold S, Jousimies-Somer H. 1997. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clin Infect Dis*, 25(S 2):194-198.
- Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 39(1):81-86.
- Marsh P, Martin MV. 2003. *Orale Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Mayrand D, Holt SC. 1988. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev*, 52(1):134-152.
- McAlister AD, Sroka A, Fitzpatrick RE, Quinsey NS, Travis J, Potempa J, Pike RN. 2009. Gingipain enzymes from *Porphyromonas gingivalis* preferentially bind immobilized extracellular proteins: a mechanism favouring colonization? *J Periodontal Res*, 44(3):348-353.
- Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. 2004. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15(6):403-413.
- Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Potempa J. 1998. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett*, 440(3):282-286.
- Mintz KP, Fives-Taylor PM. 1994. Identification of an immunoglobulin Fc receptor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 62(10):4500-4505.
- Mohan C, Hrsg. 2001. *The human IgG subclasses*. Sechste Aufl. Baltimore: Calbiochem-Novabiochem Corporation.
- Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. 2002. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*, 29(3):10-21; discussion 37-38
- Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. 2003. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 38(5):518-524.

- Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R. 2007. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 78(12):2289-2302.
- Nakagawa T, Sims T, Fan Q, Potempa J, Travis J, Houston L, Page RC. 2001. Functional characteristics of antibodies induced by Arg-gingipain (HRgpA) and Lys-gingipain (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 16(4):202-211.
- Nelson D, Potempa J, Kordula T, Travis J. 1999. Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human alpha1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem*, 274(18):12245-12251.
- Nezlin RS. 1998. The immunoglobulins: structure and function. Erste Aufl. San Diego [u.a.]: Academic Press, 3-17.
- Nibali L, Ready DR, Parkar M, Brett PM, Wilson M, Tonetti MS, Griffiths GS. 2007. Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *J Dent Res*, 86(5):416-420.
- Noiri Y, Li L, Ebisu S. 2001. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res*, 80(10):1930-1934.
- Norskov-Lauritsen N, Kilian M. 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 9):2135-2146.
- O'Brien-Simpson NM, Black CL, Bhogal PS, Cleal SM, Slakeski N, Higgins TJ, Reynolds EC. 2000. Serum immunoglobulin G (IgG) and IgG subclass responses to the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complex of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *Infect Immun*, 68(5):2704-2712.
- O'Brien-Simpson NM, Paolini RA, Hoffmann B, Slakeski N, Dashper SG, Reynolds EC. 2001. Role of RgpA, RgpB, and Kgp proteinases in virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a murine lesion model. *Infect Immun*, 69(12):7527-7534.
- Offenbacher S, Barros SP, Singer RE, Moss K, Williams RC, Beck JD. 2007. Periodontal Disease at the Biofilm-Gingival Interface. *J Periodontol*, 78: 1911-1925.
- Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. 1999. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett*, 178(2):299-304.
- Onishi S, Honma K, Liang S, Stathopoulou P, Kinane D, Hajishengallis G, Sharma A. 2008. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun*, 76(1):198-205.
- Page RC, Schroeder HE. 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 34(3):235-249.
- Panzner KD, Glockmann K, Glockmann E. 2009. Ursachen des Zahnverlustes - Ergebnisse einer freiwilligen Studie in Thüringen. *Thüringer Zahnärzte Blatt*, 9:9-10.
- Persson GR, Persson RE. 2008. Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. *J Clin Periodontol*, 35(8):362-379.
- Petersen P, Ogawa H. 2005. Strengthening the prevention of periodontal disease: The WHO approach. *J Periodontol*, 76(12):2187-2193.

- Petit MD, van Steenberghe TJ, Timmerman MF, de Graaff J, van der Velden U. 1994. Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 21(2):76-85.
- Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. 1996. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *Bacteriol*, 178(10):2876-2882.
- Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. 2003. Structure and function of the tooth–epithelial interface in health and disease. *Periodontol* 2000, 31:12-31.
- Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. 2007. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *J Immunol*, 178(11):7242-7250.
- Potempa J, Banbula A, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000, 24:153-192.
- Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen KA, Wawrzonek K, Manandhar SP, Popadiak K, Riesbeck K, Eick S, Blom AM. 2009. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog*, 5(2):e1000316.
- Rassow J. 2008. Auffüllung der Energiespeicher. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, Hrsg. *Biochemie*. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag, 253-258.
- Ren XY, Xu L, Meng HX. 2008. Interleukin-1 family polymorphisms in aggressive periodontitis patients and their relatives. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 40(1):28-33.
- Reich E, Hiller KA. 1993. Reasons for tooth extraction in the western states of Germany. *Community Dent Oral Epidemiol*, 21(6):379-383.
- Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, Bernimoulin JP, Göbel UB, Moter A. 2009. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol*, 47(6):1705-1711.
- Roberts FA, Darveau RP. 2002. Beneficial bacteria of the periodontium. *Periodontol* 2000, 30: 40-50.
- Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL. 2007. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 78(3):550-558.
- Ryan MH, Petrone D, Nemeth JF, Barnathan E, Björck L, Jordan RE. 2008. Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid. *Mol Immunol*, 45(7):1837-1846.
- Sabet M, Lee SW, Nauman RK, Sims T, Um HS. 2003. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*, 149(Pt 12):3617-3627.
- Saito T, Ishihara K, Kato T, Okuda K. 1997. Cloning, expression, and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 65(11):4888-4891.
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2002. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 3):841-849.
- Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2001. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol*, 45(1):39-44.
- Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. 2008. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol*, 35(8):398-409.

- Sanderink RB, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004a. Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie. Erste Aufl. Berlin [u.a.]: Quintessenz-Verlag, 197-257.
- Sanderink RB, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004b. Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie. Erste Aufl. Berlin [u.a.]: Quintessenz-Verlag, 101-168.
- Sanderink RB, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004c. Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie. Erste Aufl. Berlin [u.a.]: Quintessenz-Verlag, 169-193.
- Santos SG, Diniz CG, Silva VL, Martins WA, Cara DC, Souza NC, Serufo JC, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM. 2007. Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella intermedia* during experimental infection in gnotobiotic mice. *J Med Microbiol*, 56(Pt 3):289-297.
- Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. 2008. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res*, 43(3):352-359.
- Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. 2007. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol*, 34(7):566-573.
- Schreiner HC, Sinatra K, Kaplan JB, Furgang D, Kachlany SC, Planet PJ, Perez BA, Figurski DH, Fine DH. 2003. Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12):7295-7300.
- Schütt C, Bröker B. 2009. *Grundwissen Immunologie*. Zweite Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Scott MG, Briles DE, Nahm MH. 1990. Selective IgG subclass expression: biological, clinical and functional aspects. In: Shakib F, Hrsg. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Erste Aufl. Oxford: Pergamon Press, 161-183.
- Shah HN, Collins DM. 1990. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol*, 40(2):205-208.
- Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, Kuramitsu HK. 2005. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol*, 20(1):39-42.
- Shelburne CE, Coopamah MD, Sweier DG, An FY, Lopatin DE. 2007. HtpG, the *Porphyromonas gingivalis* HSP-90 homologue, induces the chemokine CXCL8 in human monocytic and microvascular vein endothelial cells. *Cell Microbiol*, 9(6):1611-1619.
- Shenker BJ, Demuth DR, Zekavat A. 2006. Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. *Infect Immun*, 74(4):2080-2092.
- Sigusch B, Klinger G, Holtz H, Süss J. 1992. In vitro phagocytosis by crevicular phagocytes in various forms of periodontitis. *J Periodontol*, 63:496-501.
- Silbernagel S, Despopoulos A. 2003. *Taschenatlas der Physiologie*. Sechste Aufl. Stuttgart [u.a.]: Georg Thieme Verlag, 94-99.
- Slots J. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. *Periodontol 2000*, 20:7-13.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25:134-144.

- Söder B. 1999. Neutrophil elastase activity, levels of prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase-8 in refractory periodontitis sites in smokers and non-smokers. *Acta Odontol Scand*, 57(2):77-82.
- Söder B, Jin LJ, Wickholm S. 2002. Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29(5):384-391.
- Sroka A, Sztukowska M, Potempa J, Travis J, Genco CA. 2001. Degradation of host heme proteins by lysine- and arginine-specific cysteine proteinases (gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 183(19):5609-5616.
- Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tärnvik A. 1985. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol*, 19(1):85-94.
- Takahashi N, Kobayashi M, Takaki T, Takano K, Miyata M, Okamatsu Y, Hasegawa K, Nishihara T, Yamamoto M. 2008. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 23(3):259-264.
- Takeuchi Y, Aramaki M, Nagasawa T, Umeda M, Oda S, Ishikawa I. 2006. Immunoglobulin G subclass antibody profiles in *Porphyromonas gingivalis*-associated aggressive and chronic periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*, 21(5):314-318.
- Takii R, Kadowaki T, Baba A, Tsukuba T, Yamamoto K. 2005. A functional virulence complex composed of gingipains, adhesins, and lipopolysaccharide shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune systems. *Infect Immun*, 73(2):883-893.
- Tran SD, Rudney JD. 1999. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*, 37(11):3504-3508.
- Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. 1997. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodontal Res*: 32(1 Pt 2):120-125.
- Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Goncalves RB, Sallum AW, Line SR. 2002. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29(3):233-239.
- Uitto VJ. 2003. Gingival crevice fluid-an introduction. *Periodontol 2000*, 31:9-11.
- Uitto VJ, Grenier D, Chan EC, McBride BC. 1988. Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola*. *Infect Immun*, 56(10):2717-2722.
- Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. 2003. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31:77-104.
- van Winkelhoff AJ, Slots J. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol 2000*, 20:122-135.
- Vincents B. 2006. Novel cysteine proteases and their interactions with human cystatins [Dissertation]. Lund: Lund-Universität.
- Vincents B, von Pawel-Rammingen U, Eick S, Hirsch C, Guentsch A, Kostolowska D, Potempa J, Abrahamson M. (unveröffentlicht). Gingipain K from *Porphyromonas gingivalis* is a professional IgG cleaving protease [persönliche Mitteilung]. Lund: Lund-Universität [u.a.].
- Voigt T. 2007. Nachweis parodontopathogener Bakterien mittels quantitativer Real-time PCR [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

- Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. 2001. Effect of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* protease on the proliferation of gingival epithelial cells. *Oral Dis*, 7(4):233-237.
- Wegner K. 2007. Untersuchung zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Moxifloxacin bei schweren Formen chronischer Parodontitis [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Wilton JMA, Bampton JML, Hurst TJ, Caves J, Powell JR. 1993. Interleukin-1-beta and IgG subclass concentrations in gingival crevicular fluid from patients with adult periodontitis. *Archs Oral Biol*, 38(1):55-60.
- Yamanaka T, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Yamane K, Sugimori C, Nambu T, Mori N, Nishikawa H, Walker CB, Leung KP, Fukushima H. 2009. Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17. *BMC Microbiol*, 9:11.
- Yanagisawa M, Kuriyama T, Williams DW, Nakagawa K, Karasawa T. 2006. Proteinase activity of *Prevotella* species associated with oral purulent infection. *Curr Microbiol*, 52(5):375-378.
- Yasuhara R, Miyamoto Y, Takami M, Imamura T, Potempa J, Yoshimura K, Kamijo R. 2009. Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharide- and active-vitamin D3-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. *Biochem J*, 419(1):159-166.
- Yokoyama K, Sugano N, Shimada T, Shofiqur RA, Ibrahim el-SM, Isoda R, Umeda K, Sa NV, Kodama Y, Ito K. 2007. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. *J Oral Sci*, 49(3):201-106.

9 Anhang

Rezepturen

Detektion von IgG1 und IgG2 (zu Kap. 4.4.2): Gele und Pufferlösungen zur SDS-PAGE und zum Western Blot

Trenngel (10%), für 15 ml, ausreichend für 2 Gele:

- 1,20 ml A. dest.
- 3,75 ml 4xAcrylamid
- 3,05 ml Methylenbisacrylamid
- 5,00 ml Gelpuffer
- 2,00 ml Glycerin
- 100 µl APS
- 10 µl TEMED

Sammelgel (4%), für 12,5 ml, ausreichend für 2 Gele:

- 7,15 ml A. dest.
- 1,25 ml 4xAcrylamid
- 1,00 ml Methylenbisacrylamid
- 3,10 ml Gelpuffer
- 100 µl APS
- 10 µl TEMED

Gelpuffer (pH 8,45), für 100 ml:

- 36,35 g 3 M Tris
- 50 ml A. dest.
- pH-Einstellung auf 8,45 mit 10 M HCl
- Volumen auf 100 ml auffüllen mit A. dest.
- 0,3 g 0,3 % SDS

Kathodenpuffer (5-fach konzentriert, pH~8,25), für 1 l

- 61,0 g 0,5 M Tris
- 89,5 g 0,5 M Tricine
- 5,0 g 0,5% SDS

- 1 l A. dest.
- vor Gebrauch Verdünnung auf 1-fache Konzentration mit A. dest.

Anodenpuffer (5-fach konzentriert, pH 8,9), für 1 l

- 121,1 g 0,5 M Tris
 - 1 l A. dest.
 - Einstellung pH 8,9 mit 10 M HCl
- vor Gebrauch Verdünnung auf 1-fache Konzentration mit A. dest.

Probenpuffer A (nicht reduzierend), für 10 ml

- 2 ml 0,5 M Tris
- 1,6 ml Glycerol
- 3,2 ml 10% SDS
- 1,2 ml A. dest.
- eine Spatelspitze Bromphenolblau

Probenpuffer B (reduzierend, 200 mg DTT / ml Puffer), für 8 ml

- 8,0 ml Probenpuffer A
- 1,6 g DTT

Transferpuffer (pH ~ 8,3), für 2 l:

- 6,06 g 2,5 mM Tris
- 28,8 g 192 mM Glycin
- 400 ml 20% Methanol
- 1600 ml A. dest.

Waschpuffer, für 1 l

- 1 Tütchen TBS-T (SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA)
- 1 l A. dest.

Blockpuffer, für 50 ml, ausreichend für 2 Membranen:

- 50 ml Waschpuffer
- 2,5 g Magermilchpulver, Instant (Naturaflor, Töpfer GmbH, Dietmannsried, Deutschland)

Antikörper-Puffer, für 100 ml:

- 100 ml Waschpuffer
- 1 g BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Messung der Gingipain K-Konzentrationen (zu Kap. 4.6.3): Pufferlösungen zum ELISA

Coating-Puffer (pH 9,6), für 200 ml:

- Puffer A: 2,12 g 0,2 M Na_2CO_3 / 100 ml A. dest.
- Puffer B: 3,36 g 0,2 M NaHCO_3 / 100 ml A. dest.
- 16 ml Puffer A + 32 ml Puffer B + 152 ml A. dest.

Waschpuffer (PBS-T, pH ~ 7,4), für 1 l:

- 1,44 g KH_2PO_4
- 90,00 g NaCl
- 7,94 g Na_2HPO_4
- 2,00 g KCl
- 1000 ml A. dest.
- 500 μl Tween-20

Blocking Puffer (2 % BSA / PBS-T), für 100 ml:

- 100 ml Waschpuffer
- 2 g BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Probenpuffer (1 % BSA / PBS-T), für 100 ml:

- 100 ml Waschpuffer
- 1 g BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7,0, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Keimbelastung der Proben

Tabelle 8 (zu Kap. 5.2): Zahl der nachgewiesenen Bakterien pro Probe in der Kontrollgruppe

Probe Nr.	A.a.	P.g.	P.i.	T.f.	T.d.
1a	0	0	0	0	0
1b	0	0	0	0	0
2a	0	0	0	46	0
2b	30	0	0	0	0
3a	62	0	0	11	0
3b	0	0	0	3	0
4a	0	0	0	0	0
4b	238	0	0	55	0
5a	27	0	0	0	0
5b	105	0	0	0	0

Tabelle 9 (zu Kap. 5.2): Zahl der nachgewiesenen Bakterien pro Probe in der Gruppe mit AP (fortlaufend S. 87)

Probe Nr.	A.a.	P.g.	P.i.	T.f.	T.d.
6a	99	2.150	0	0	0
6b	656	1.327	0	0	0
6c	16.614.660	65.329	0	2.965	144
6x	118.851	4	0	0	317
6y	556	288	0	0	6.431
6z	103.650	1.624.240	0	86.612	2.220
7a	0	0	4.440	852	0
7b	0	405	45.852	577.951	1.478
7c	0	185.959	175	2.334.274	3.413
7x	0	6	0	252	0
7y	0	7.381.851	1.532	774.325	0
7z	0	7.398	24.779.891	1.127.516	0
8a	0	787	0	295	0
8b	0	85	0	2.671	0
8c	0	19.278	0	1.825	1.021.628
8x	0	9.327	0	668	0
8y	0	18.118	0	5.828	0
8z	0	6.052	0	19.272.438	2.171
9a	3.260.264	2.358	0	14	0
9b	49	10.076	0	175	0
9c	83	13.102	0	3	821
9x	199	0	0	464	0
9y	4428	1.338	0	826	1.254
9z	0	3.201	0	2.555	227.376
10a	0	0	0	8	0
10b	0	189.551	0	5	151
10c	0	354.110	0	12.925	0

10x	0	0	0	108	0
10y	0	25.221	0	0	0
10z	343	256.879	0	0	2.534
11a	0	0	0	24.201	0
11b	1042	0	0	0	13.341
11c	268	0	0	166.271	0
11x	0	0	0	0	0
11y	0	0	0	5.218	0
11z	128	0	0	0	7.351
12a	0	0	0	0	0
12b	0	327.534	1.502	4.275	0
12c	0	24.838.504	52.364	0	1.981.697
12x	0	0	0	186	124
12y	0	813	0	8.497	152
12z	0	9.145	12.587	647	367
13a	0	0	0	145	0
13b	0	0	0	20.159	0
13c	0	0	0	2	869
13x	0	0	0	1	0
13y	0	0	0	10	0
13z	0	2.577	0	0	762
14a	124	61	0	472	0
14b	525	54.533	0	5.426	0
14c	0	101.904	0	2	1.813
14x	0	0	0	8.357	0
14y	0	8	0	17.422.093	0
14z	0	17	0	2.527	0

Tabelle 10 (zu Kap. 5.2): Zahl der nachgewiesenen Bakterien pro Probe in der Gruppe mit CP (fortlaufend S. 88)

Probe Nr.	A.a.	P.g.	P.i.	T.f.	T.d.
15a	0	0	0	0	3.304
15b	0	323	0	395	0
15c	0	422.192	0	2.554	3.383.816
15x	0	0	0	0	250
15y	0	645	0	80	355
15z	0	13.456	0	249.015	213
16a	0	0	0	0	5.162
16b	263	353	0	1.958	465
16c	1587	12.558	0	102	923
16x	15	0	0	320	185
16y	140	65.833	0	356	68
16z					
17a	0	369	0	50.922	0
17b	0	5.874	0	215.009	0
17c	0	24.668	0	10.197	0
17x	0	0	0	0	0
17y	0	15.510	0	51.639	0
17z	0	248.732	0	2.626	0
18a	0	19.528	1.282	2.175	0

18b	0	1.263.647	60.112	0	0
18c	0	906.133	269	0	189.153
18x	0	23	45.797	0	671
18y	0	325.672	939	0	189.153
18z	0	683.878	16.854	14.066	1.091.586
19a	1511	25	0	1.610	0
19b	0	3.122	0	276	0
19c	13025	15.993	0	320.291	0
19x	763	0	0	2.300	0
19y	1004	21.953	0	34.908	0
19z	37	0	0	31.214	0
20a	0	0	0	0	1.375
20b	0	4.186	0	1.029	1.538
20c	1.753	170.022	0	313	48.643
20x	0	0	0	0	0
20y	0	5.836.627	0	285.759	48.643
20z	0	50.654.684	7.596	3.771	2.735.993
21a	0	0	0	0	456
21b	0	134.744	0	0	1.123
21c	541	3.510	0	0	0
21x	318	16	0	0	0
21y	1.304	25.554	0	0	0
21z	0	966	0	5.547	389
22a	0	52	0	0	0
22b	0	987	0	0	0
22c	0	28.256	0	0	0
22x	0	0	0	842	0
22y	266	76.270.713	256	56.257	0
22z	0	1.173.352	0	1.102	0
23a	0	0	0	0	115
23b	24	32.581	0	0	39.393
23c	0	24.458	0	0	0
23x	0	3.720	0	0	0
23y	0	628.957	0	0	8.241.960
23z	0	582.230	0	1.592	0

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Hirsch, Christiane
Geburtsdatum, -ort	19. Juli 1982 in Jena
Familienstand	ledig
wohnhaf in	Wöllnitzer Str. 58a, 07749 Jena

Schul Ausbildung

09/1989 – 07/1991	Julius-Schaxel-Oberschule I, Jena
09/1991 – 07/1993	Staatliche Grundschule „Rodatalschule“, Jena
09/1993 – 06/2001	Staatliches Gymnasium „Ernst-Haeckel“, Jena
06/2001	Abitur

Studium

10/2001 – 12/2007	Zahnmedizin studium an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
12/2007	Zahnmedizinisches Staatsexamen
02/2008	Approbation als Zahnärztin
03 - 04/2008	2-wöchiger Aufenthalt an der Fakultät für Biochemie, Biophysik und Biotechnologie / Fachbereich Mikrobiologie an der Jagiellonen-Universität, Krakau im Rahmen der vorliegenden Arbeit
04 – 09/2008	Promotionsstudentin an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Beruflicher Werdegang

seit 09/2008	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. P. Wintzler, Gera
--------------	--

Jena, 04.11.2009

Danksagung

Dem Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube, gilt mein Dank für die uneingeschränkte Nutzung der Räumlichkeiten des Institutes.

Im Besonderen möchte ich Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister und Frau PD Dr. med. dent. habil. S. Eick für die Überlassung des Themas und die zuverlässige, fortwährende Unterstützung sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Erstellung der schriftlichen Arbeit danken.

Prof. Dr. med. dent. habil. E. Glockmann und besonders Dr. med. dent. A. Güntsch gilt mein Dank für die Nutzung der Räumlichkeiten der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde, die Vermittlung der Patienten sowie die freundliche Hilfe bei der Planung der Probengewinnung.

Ebenso möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. habil. J. Potempa, Leiter des Fachbereiches Mikrobiologie am Institut für Biochemie, Biophysik und Biotechnologie der Jagiellonen-Universität, Krakau für die Inspiration zu dieser Studie, die Einladung an die Jagiellonen-Universität sowie die Nutzung der Räumlichkeiten seiner Abteilung danken. Frau MSc. A. Sroka gilt in diesem Rahmen besonderer Dank für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die freundliche Hilfe während des Aufenthaltes in Krakau.

Frau C. Ranke, MTA im Forschungsbereich „Orale Mikrobiologie“ des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, danke ich sehr für die geduldige und stets motivierende Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner Schwester Ulrike für ihre Unterstützung, Motivation und uneingeschränkten Rückhalt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. S. Eick, Dr. A. Güntsch und MSc. A. Sroka,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 04.11.2009